



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Utilización de plantas puente como herramienta de mejoramiento en el complejo

Calibrachoa – Petunia

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Ing. Agr. Víctor José Milicia

Director de tesis: Dra. Silvina Soto

Consejero de Estudios: Dra. Beatriz Saidman

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ

Buenos Aires, 2023

PUBLICACIONES

Milicia, V.J., Rodriguez, M. F., Hagiwara, J. C. y Soto, M. S. Utilización de plantas puente en el mejoramiento del complejo *Calibrachoa* – *Petunia*. Chilean journal of agricultural & animal sciences (2021) 37(2):136-150.

<https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-16UPVM40016>

Milicia, V. J., Chorzempa S. E., Rodríguez, M.F. y Soto, M. S. Avances en estudios de meiosis en híbridos intergenéricos entre *Petunia* y *Calibrachoa*. Revista Científica y Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental (2023) 10 (1): 3-19.

<http://servicios.ingenieria.unlz.edu.ar:8080/ojs/index.php/agrarias/issue/view/28/showToc>

ÍNDICE GENERAL

Publicaciones y/o presentaciones a eventos científicos derivados a partir de la tesis.....	i
Índice General.....	ii
Índice de Tablas.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Agradecimientos	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
Introducción general.....	1
Importancia del germoplasma argentino para el desarrollo de nuevos cultivos ornamentales.....	1
Sinopsis de la historia taxonómica de los géneros <i>Petunia</i> y <i>Calibrachoa</i>	3
Antecedentes de uso ornamental de los géneros <i>Petunia</i> y <i>Calibrachoa</i>	4
Objetivo general.....	7
Hipótesis.....	7
Capítulo I - Estudio de las relaciones de compatibilidad en cruzamientos intergenéricos entre especies del género <i>Calibrachoa</i> y <i>Petunia</i>	8
Introducción.....	9
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos.....	14
1. Obtención de híbridos puente putativos	14
1.1. Cruzamientos.....	14
1.2. Siembra de semillas híbridas y cultivo de las plantas obtenidas.....	16
1.3 Propagación agámica de híbridos obtenidos.....	17
2. Identificación de híbridos.....	17
2.1. Estudios por citometría de flujo.....	17
2.2. Estudios por viabilidad del polen híbrido.....	18
2.3. Estudios moleculares.	19
Resultados.....	24
1. Obtención de híbridos puente putativos	24
1.1. Cruzamientos.....	24

1.1.1. Cruzamientos utilizando <i>Petunia integrifolia</i> como parental femenino ...	24
1.1.2. Cruzamientos utilizando <i>Petunia inflata</i> como parental femenino.....	26
1.1.3. Cruzamientos utilizando <i>Petunia axillaris</i> como parental femenino.....	27
1.1.4. Cruzamientos utilizando <i>Petunia interior</i> como parental femenino	28
1.2. Obtención y cultivo de plantas híbridas	39
1.2.1. Caracterización morfológica del híbrido puente y sus parentales.....	30
2. identificación de híbridos	35
2.1. Identificación del híbrido por citometría de flujo	35
2.2. Estudios de viabilidad del polen híbrido.....	36
2.3. Estudios moleculares para la verificación del híbrido HPC.	37
3. Cruzamientos puente con el género <i>Petunia</i>	38
4. Cruzamientos puente con el género <i>Calibrachoa</i>	39
Discusión.....	48
Bibliografía.....	54

Capítulo II- Embriogénesis y endospermogénesis en la hibridación

interegenérica entre <i>Calibrachoa</i> y <i>Petunia</i>	66
Introducción.....	67
Embriología de la familia Solanaceae	69
Objetivos.....	71
Materiales y Métodos.....	72
1. Observación de cortes histológicos y estudios de embriología en semillas híbridas.....	72
2. Corte manual de semillas maduras.....	75
Resultados.....	76
1. Observación de cortes histológicos y estudios de embriología en semillas híbridas.....	76
2. Corte manual de semillas maduras.....	83
Discusión.....	85
Bibliografía.....	91

Capítulo III- Estudios de los cromosomas meióticos en el híbrido puente entre

<i>Calibrachoa</i> y <i>Petunia</i>	95
Introducción.....	96

Objetivos.....	98
Materiales y Métodos.....	99
Resultados.....	100
1. Estudios de cromosomas meióticos del híbrido intergenérico HPC y sus parentales	100
Discusión.....	111
Bibliografía.....	115
Anexos.....	123

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I

Tabla 1. Preparación de los buffer utilizados para el análisis de ADN por citometría de flujo.....	18
Tabla 2. Iniciadores ISSR utilizados en las reacciones de PCR.....	20
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción.....	21
Tabla 1.1. Tasa de Fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).....	25
Tabla 1.2. Tasa de Fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).....	26
Tabla 1.3. Tasa de Fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).....	27
Tabla 1.4. Tasa de Fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).....	28
Tabla 1.5. Características morfológicas sobresalientes de los géneros <i>Petunia</i> y <i>Calibrachoa</i> observadas en el híbrido puente HPC (<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow).....	35
Tabla 1.6. Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental masculino y las especies de <i>Petunia</i> utilizadas.	39
Tabla 1.7. Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental femenino y las especies de <i>Petunia</i> utilizadas.....	39
Tabla 1.8. Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental femenino y las especies del género <i>Calibrachoa</i> utilizadas.....	40
Tabla 1.9 Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental masculino y las especies del género <i>Calibrachoa</i> utilizadas.....	40
Tabla 1.10. Características morfológicas sobresalientes de los géneros <i>Petunia</i> y <i>Calibrachoa</i> observadas en el híbrido puente HPC (<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i>	

var. Kabloom yellow) y en las plantas obtenidas por los cruzamientos en que interviene.....	47
---	----

Capítulo II

Tabla 1. Proceso de deshidratación de los frutos de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	73
Tabla 2. Proceso de aclarado de los frutos de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	73
Tabla 3. Proceso de inclusión en parafina de los frutos de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies nativas de <i>Petunia</i> utilizadas en los cruzamientos intergenéricos.....	14
Figura 2. Especies nativas y comerciales de <i>Calibrachoa</i> utilizadas en los cruzamientos intergenéricos	15
Figura 3. Invernaderos y mesadas con ejemplares cultivados	16
Figura 4. Esquema del programa utilizado en el termociclador My Cycler de BioRad	22
Figura 5. Equipamiento utilizado para estudios moleculares	22
Figura 1.1. Formación de frutos en especies nativas de <i>Petunia</i> utilizadas en los cruzamientos intergenéricos	25
Figura 1.2. Formación de frutos en especies nativas de <i>Petunia</i> utilizadas en los cruzamientos intergenéricos.	27
Figura 1.3. Formación de frutos en especies nativas de <i>Petunia</i> utilizadas en los cruzamientos intergenéricos.	29
Figura 1.4. Colección de semillas y plántula híbrida obtenida.	29
Figura 1.5. Morfología del híbrido HPC.....	31
Figura 1.6. Características morfológicas de la flor del híbrido HPC y sus parentales.....	34
Figura 1.7. Histograma obtenido por citometría de flujo	36
Figura 1.8. Tinción de granos de polen por método de Alexander.....	37
Figura 1.9. Perfiles de amplificación del híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow (HPC).....	38
Figura 1.10. Tamaño comparativo de los frutos obtenidos en los cruzamientos puente.....	41
Figura 1.11. Plántulas obtenidas por la siembra de semillas obtenidas en los cruzamientos puente.....	42
Figura 1.12. Plantas obtenidas en los cruzamientos puente de <i>P. inflata</i> x HPC	43
Figura 1.13. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre <i>P. inflata</i> x HPC y sus parentales.....	44
Figura 1. 14. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x <i>P. integrifolia</i>	45

Figura 1.15. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x <i>P. inflata</i> y sus parentales.....	46
Figura 2.1. Óvulos de <i>P. inflata</i> utilizada en los cruzamientos intergenéricos.....	77
Figura 2.2. Cigotos de <i>Petunia</i> a 4 DPP	77
Figura 2.3. Proembriones de <i>Petunia</i> a 5 DPP.....	78
Figura 2.4. Endospermas de <i>Petunia</i> utilizadas en los cruzamientos a 5 DPP.....	78
Figura 2.5. Embriones y proembriones de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow a 6 DPP.	79
Figura 2.6. Óvulos fecundados de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow a 7 DPP	80
Figura 2.7. Desarrollo de embriones y endosperma en óvulos fecundados de <i>P. inflata</i> x <i>P. inflata</i> a 7 DPP.	81
Figura 2.8. Embriones observados excepcionalmente en cruzamientos de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow a 10 DPP.	82
Figura 2.9. Embriones observados en cruzamientos de <i>P. inflata</i> x <i>P. inflata</i> entre los 8 y 9 DPP.....	82
Figura 2.10. Semilla madura hidratada obtenida en el cruzamiento de <i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow a los 25 DPP.....	83
Figura 2.11. Tegumento de semillas híbridas obtenidas en los cruzamientos intergenéricos entre las distintas especies de <i>Petunia</i> y <i>Calibrachoa</i> que formaron frutos en el presente trabajo a los 25 DPP.....	84
Figura 2.12. Corte longitudinal de semillas obtenidas en los cruzamientos intraespecíficos testigo entre las distintas especies de <i>Petunia</i> a los 25 DPP..	84
Figura 3.1. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	100
Figura 3.2. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	101
Figura 3.3. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow	101
Figura 3.4. Cromosomas de <i>P. inflata</i> formando 7 bivalentes durante la etapa de diacinesis de la protafase I.....	102

Figura 3.5. Cromosomas de <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow formando 9 bivalentes durante la etapa de diacinesis de la protafase I.	103
Figura 3.6. Células madre del polen de <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow en metafase I meiótica.....	103
Figura 3.7. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido HPC entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	104
Figura 3.8. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow	105
Figura 3.9. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	105
Figura 3.10. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.	106
Figura 3.11. Telofases I meióticas en células madre del polen en híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	107
Figura 3.12. Telofases II meióticas en células madre del polen en híbrido entre <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow	107
Figura 3.13. Telofases I meióticas en células madre del polen en cruzamientos puente entre <i>P. inflata</i> y HPC.....	108
Figura 3.14. Telofases I meióticas en células madre del polen de <i>P. inflata</i>	109
Figura 3.15. Telofases I meióticas en células madre del polen de <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	109
Figura 3.16. Tétradas de micrósporas del híbrido HPC, <i>P. inflata</i> y <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow.....	110

AGRADECIMIENTOS

“A todos aquellos que me impulsaron, ayudaron y alentaron para que este sueño sea posible, a los que están y a los que ya partieron, les doy enormemente las gracias”.

“A la pandemia que me retrasó, me deprimió, me complicó pero no me venció”.

ABREVIATURAS

ADN (Ácido desoxirribonucleico)

AFL (Amplified fragment lenght polymorphism)

BNE (Balance del número endospérmogénico)

°C (Grados Celsius)

COD. IF (Código interno de recolección de ejemplares del Instituto de Floricultura)

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DPP (Días post polinización)

FAA (Formaldehído, alcohol, acético)

HPC (Híbrido Petunia Calibrachoa)

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria)

IRS (Intensidad relativa de fluorescencia)

ISSR (Interspread single sequence repeats)

M (Molar)

MCP (Muerte celular programada)

mg (Miligramo)

ml (Mililitro)

mM (Milimolar)

nm (Nanómetro)

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

PDI 5 (proteína disulfuro isómeras 5)

Ppm (Partes por millón)

TF (Tasa de Fructificación)

µm (Micrómetro)

µl (Microlitro)

µl/s (Microlitro por segundo)

var. (Variedad)

Utilización de plantas puente como herramienta de mejoramiento en el complejo

Calibrachoa – Petunia

RESUMEN

Esta tesis forma parte de los siguientes proyectos de investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora: "Evaluación de la implementación de técnicas agroecológicas en el cultivo y mejora genética de especies hortícolas y florícolas" y "Mejoramiento y evaluación de plantas nativas sudamericanas de interés para el mercado ornamental global".

La técnica de hibridación a través de plantas puente, utiliza cruzamientos indirectos o intermedios como instrumento para cruzar parentales con diferente nivel de ploidía. El objetivo general de este trabajo fue hallar las combinaciones intermedias compatibles entre los parentales de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* que no se cruzan en forma directa. Lo anterior permite sortear las barreras de incompatibilidad que surgen cuando la hibridación es directa entre especies. Para la obtención de híbridos se realizaron cruzamientos dirigidos entre: *P. integrifolia*, *P. inflata*, *P. interior* y *P. axillaris* subespecie *axillaris*; con *C. linoides*, *C. ovalifolia*, *C. thymifolia*, *C. caesia*, *C. x hybrida* var. *Kabloom blue* y *C. x hybrida* var. *Kabloom yellow*. El primer paso fue la detección de combinaciones putativas, para lo cual se comparó la tasa de fructificación definida como la formación de frutos cada 10 cruzamientos intergenéricos, encontrando resultados variables para cada combinación. Se obtuvo una planta híbrida entre *P. inflata* x *C. x hybrida* *Kabloom yellow*, en que los estudios morfológicos, de viabilidad del polen y moleculares confirman su naturaleza. Con el híbrido puente obtenido se realizaron cruzamientos recíprocos con todas de las especies de *Petunia* y *Calibrachoa* involucradas, obteniendo 31 plantas híbridas que comparten características morfológicas de ambos géneros en las combinaciones con *P. inflata* y *P. integrifolia*.

La identificación de cruzamientos intergenéricos con alto porcentaje de fructificación abrió una ventana hacia estudios sobre el desarrollo de los embriones híbridos. En este sentido, con el fin de estudiar las barreras post

fertilización se estudió el desarrollo del endosperma y del embrión por medio de cortes histológicos a partir de los tres y hasta los diez días luego de la polinización. Estos estudios permitieron conocer el desarrollo del embrión híbrido hasta su autólisis al sexto día luego de la polinización y el desarrollo del endosperma hasta su detención al quinto día post polinización. De esta manera se constituye una herramienta de mejoramiento que permite predecir el momento oportuno para aplicar técnicas de rescate embrionario con el objeto de aumentar el número de plantas híbridas puente.

Los estudios de meiosis en el híbrido entre *Petunia* y *Calibrachoa* permitieron reportar el número somático $2n = 16$ que confirma nuevamente su naturaleza híbrida. La presencia de polen estéril se debe a su meiosis irregular con presencia de univalentes, bivalentes y tetravalentes, puente sin fragmento y husos multipolares, mientras que los granos de polen fértiles podrían ser producto de mecanismos de eliminación y reducción del número cromosómico gamético con el fin de formar gametas balanceadas que permitieron la producción de nuevas plantas híbridas en los cruzamientos puente con el género *Petunia*.

Palabras claves: Solanaceae, hibridación intergenérica, embriogénesis, endospermogénesis, floricultura, plantas ornamentales.

Use of bridge plants as an improvement tool in the complex

Calibrachoa – Petunia

ABSTRACT

This thesis is part of the following research projects of the Faculty of Agricultural Sciences of the National University of Lomas de Zamora: "Evaluation of the implementation of agroecological techniques in the cultivation and genetic improvement of horticultural and floricultural species" and "Improvement and evaluation of South American native plants of interest to the global ornamental market.

The hybridization technique through bridge plants uses indirect or intermediate crosses as an instrument to cross parents with different levels of ploidy. The general objective of this work was to find the compatible intermediate combinations between the parents of the genera *Petunia* and *Calibrachoa* that do not cross directly. This makes it possible to overcome the incompatibility barriers that arise when hybridization is direct between species. To obtain hybrids, directed crosses were made between: *P. integrifolia*, *P. inflata*, *P. interior* and *P. axillaris* subspecies *axillaris*; with *C. linoides*, *C. ovalifolia*, *C. thymifolia*, *C. caesia*, *C. x hybrida* var. Kabloom blue and *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. The first step was the detection of putative combinations, for which the fruiting rate defined as the formation of fruits every 10 intergeneric crosses was compared, finding variable results for each combination. A hybrid plant was obtained between *P. inflata* x *C. x hybrida* Kabloom yellow, in which morphological, pollen viability and molecular studies confirm its nature. With the bridge hybrid obtained, reciprocal crosses were made with all the *Petunia* and *Calibrachoa* species involved, obtaining 31 hybrid plants that share morphological characteristics of both genera in combinations with *P. inflata* and *P. integrifolia*.

The identification of intergeneric crosses with a high fruiting percentage opened a window towards studies on the development of hybrid embryos. In this sense, in order to study the post-fertilization barriers, the development of the endosperm and the embryo was studied by means of histological sections from three to ten

days after pollination. These studies allowed us to know the development of the hybrid embryo until its autolysis on the sixth day after pollination and the development of the endosperm until its arrest on the fifth day after pollination. In this way, a breeding tool is established that allows predicting the opportune moment to apply embryonic rescue techniques in order to increase the number of bridge hybrid plants.

Meiosis studies in the hybrid between *Petunia* and *Calibrachoa* allowed us to report the somatic number $2n = 16$, which once again confirms its hybrid nature. The presence of sterile pollen is due to its irregular meiosis with the presence of univalent, bivalent and tetravalent, fragment-free bridge and multipolar spindles, while fertile pollen grains could be the product of mechanisms of elimination and reduction of the gametic chromosome number in order to form balanced gametes that allowed the production of new hybrid plants in bridge crosses with the genus *Petunia*.

Keywords: Solanaceae, intergeneric hybridization, embryogenesis, endospermogenesis, floriculture, ornamental plants.

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del germoplasma argentino para el desarrollo de nuevos cultivos ornamentales.

En el mundo se destinan 400.000 hectáreas a la producción de flores de corte y plantas ornamentales. El productor mundial más importante es la Unión Europea que concentra el 34% de la producción global. Lo siguen en importancia China con 16%, Estados Unidos con 14%, Japón con 8% y Colombia con 3% de participación (Rojas *et al.*, 2019; Kanaya, 2016).

Gran cantidad de especies ornamentales que se cultivan en el mundo provienen de germoplasma sudamericano mejorado por empresas internacionales fuera de la región.

El enorme potencial ornamental que tiene la flora de nuestro país, aún no se ha aprovechado en toda su magnitud, ni por las grandes empresas florícolas internacionales ni por el sector productivo local que cuenta con los recursos fitogenéticos a su alcance.

El término aprovechamiento o utilización sustentable de un recurso fitogenético nativo con fines ornamentales puede emplearse de dos maneras: a) utilización directa por los sistemas de producción y b) utilización intermedia, por ejemplo, como objeto de investigaciones o en programas de mejoramiento genético. En el primer caso, se introducen a cultivo especies en su estado original, mientras que en el segundo caso las especies son utilizadas en investigaciones y programas de mejoramiento genético, con el fin de incorporar variabilidad a cultivos ya existentes o bien desarrollar a partir de ellas nuevos cultivos, obteniendo cultivares con características ornamentales superiores a las que naturalmente poseen las especies en su estado silvestre. Esto último implica el agregado de valor, ya que el desarrollo de cultivares, a diferencia de una especie nativa, posee propiedad intelectual (Soto *et al.*, 2022).

La extensión del territorio argentino permite la existencia de una gran diversidad de hábitats y climas, y posiciona a la Argentina entre los países de mayor biodiversidad. Según las estimaciones realizadas por "diversas instituciones", la flora vascular de la Argentina comprende un total de 248 familias, 1.927 géneros y 9.690 especies, incluyendo 45 géneros y 1.960 especies endémicas (Zuloaga

& Morrone, 1999). Esto ubica a la Argentina en el puesto 17 entre los países con mayor diversidad de plantas y es la base de un enorme potencial para desarrollar variedades para distintos usos a partir de la flora autóctona. Si bien a nivel nacional el uso de los recursos vegetales nativos con valor ornamental ha sido escasamente desarrollado, desde hace más de 40 años empresas de diferentes países han colectado, domesticado y mejorado germoplasma, cuya zona de origen y distribución incluye a la Argentina. De este modo, se han obtenido variedades que se comercializan en todo el mundo, tales como aquellas pertenecientes a los géneros *Alstroemeria* L., *Petunia* Juss., *Glandularia* J.F.Gmel., *Verbena* L., *Calceolaria* L., entre otros (Facciuto *et al.*, 2019).

Desde 1999, el Instituto de Floricultura del INTA se dedica al mejoramiento genético de variedades ornamentales a partir de flora nativa. Este camino, que comienza con la exploración de plantas nativas y termina con la obtención de variedades, es el resultado de diferentes etapas tales como recolección, domesticación, caracterización, mejoramiento, evaluación y, finalmente, registro de variedades y transferencia al sector productivo (Facciuto *et al.*, 2019).

La actividad florícola argentina presenta una fuerte dependencia de variedades extranjeras, lo que implica el pago de regalías, inclusive para aquellas variedades originadas a partir de especies nativas locales. Asimismo, en muchos casos, las variedades disponibles, al haber sido mejoradas genéticamente en otros países, no están adaptadas a condiciones agroecológicas locales. Por otro lado, la gran diversidad biológica que presenta la Argentina la posiciona en un lugar clave como fuente de variabilidad para nuevos cultivos, habiendo contribuido con un importante número de especies en el desarrollo de variedades comercializadas mundialmente pertenecientes a géneros como *Petunia*, *Glandularia*, *Portulaca* L., *Alstroemeria*, *Calceolaria* y *Calibrachoa* Cerv. (Facciuto *et al.* 2019).

El INTA, a través del proyecto antes mencionado, ha dado un primer paso hacia el desarrollo en la Argentina de la industria del mejoramiento de plantas ornamentales aprovechando los recursos fitogenéticos del país y, actualmente, cuenta con cultivares propios que fueron obtenidos utilizando herramientas clásicas de mejoramiento genético como cruzamientos interespecíficos y la selección de genotipos “elite” que luego son propagados en forma agámica mediante el enraizamiento de esquejes (Greppi, 2014). Debido a que la industria

de la horticultura ornamental o floricultura se encuentra permanentemente en la búsqueda de novedades, estos nuevos cultivos resultan de gran utilidad para aquellos productores que buscan diversificar sus cultivos y así, incrementar su participación en el mercado (Greppi, 2014). Por otro lado, se debe destacar la creciente importancia de las plantas ornamentales en los jardines y en los ecosistemas urbanos para mitigar el cambio climático y brindar bienestar. Los jardines pueden presentarse en muchas formas, desde un solo contenedor hasta un gran jardín doméstico. Son espacios multifuncionales, importantes para la salud y el bienestar social, al tiempo que apoyan el medio ambiente natural al ayudar a mantener la vida silvestre. Los jardines también brindan importantes servicios ecosistémicos, como la mitigación de inundaciones urbanas, enfriamiento urbano, aislamiento de edificios, captura de contaminantes y secuestro de carbono (Bonells, 2019). En este sentido el desarrollo de nuevos materiales nativos favorece del funcionamiento de estos ecosistemas y enriquece su biodiversidad (Haene, 2018).

Sinopsis de la historia taxonómica de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*

La familia *Solanaceae* Adans cuenta con alrededor de 100 géneros y 2800 especies, distribuidas en su mayoría en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Muchos de los miembros de esta familia son fuentes de recursos para la industria farmacéutica, tal es el caso de *Nicotiana* L., *Datura* L. y *Atropa* L., así como también otros miembros son importantes fuentes de alimento como: *Capsicum* L., *Physalis* L. y *Solanum* L. Otra importante utilización para muchos de sus géneros es el uso ornamental como: *Brugmansia* Pers., *Cestrum* L., *Nierembergia* Ruiz & Pavon, *Petunia*, *Physalis*, *Solanum*, entre otros (Berry & D'Arcy, 2018).

El género *Petunia* está constituido por 15 especies presentes en el sur de América entre los 22° y 39° S. En la Argentina habitan siete especies en una altitud que se extiende desde el nivel del mar hasta 2000 msm (Stehmann & Greppi, 2013).

En el año 1985, Wijsman & De Jong separaron el género *Petunia* en *Petunia* y *Calibrachoa* basándose en el número de cromosomas $2n = 14$ y 18 , respectivamente. Posteriormente nuevos estudios citológicos, moleculares y anatómicos de semillas y hojas aportaron mayor información que justificó la

separación de estos géneros (Kulcheski *et al.*, 2006; Ando *et al.*, 1992, 2005; Stehmann *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996, 1999; Reis *et al.*, 2002) En 1990, 15 especies del género *Petunia* fueron transferidas al género *Calibrachoa* (Wijsman, 1990) y se agregaron 10 especies adicionales (Stehmann & Semir, 1997).

En la actualidad el género *Calibrachoa* está constituido por 25 especies distribuidas en el sur de América entre los 18° y 37° S, con la excepción de *C. parviflora* que crece también en América Central y del Norte y en Europa como planta invasora (Stehmann, 1999). En la Argentina habitan 12 especies nativas, siendo la región mesopotámica su centro de distribución principal (Greppi *et al.*, 2013).

Morfológicamente, el género *Calibrachoa* se distingue por el hábito de crecimiento subarborescente, menos frecuentemente herbáceo, corola infundibuliforme, zigomorfa, prefloración reciprocativa (el lóbulo anterior induplicado cubre a los otros cuatro lóbulos conduplicados), anteras amarillas y células de la cubierta seminal con pared anticlinal recta. Por su parte, *Petunia* posee, en general, hábito herbáceo, corola infundibuliforme, campanulada o hipocraterimorfa, zigomorfa o actinomorfa, prefloración imbricada, anteras amarillas o violáceas y células de la cubierta seminal con pared anticlinal ondulada (Greppi *et al.*, 2013).

Antecedentes de uso ornamental de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*

El género *Petunia* se difunde alrededor del mundo como uno de los cultivos florales más importantes a partir de las "petunias de jardín". Estas se destacan por los variados colores de sus flores en forma de embudo o trompeta, su amplia floración y su fácil cultivo, cualidades de gran interés para el paisajismo y la jardinería (Greppi, 2019).

Originalmente descrita por el botánico francés Antoine-Laurent de Jussieu en 1803 a partir de un material colectado en Uruguay, la petunia se difundió rápidamente por toda Europa desde la obtención del híbrido *Petunia x hybrida* Vilmoren.

La Argentina es el segundo país del mundo, luego de Brasil, con la mayor cantidad de especies nativas de *Petunia*. Seis de las siete especies nativas

habitan diversos ambientes de la región Noreste, mientras que sólo una se encuentra en el Noroeste (Greppi, 2019).

La incorporación de las petunias nativas a los programas de mejoramiento genético con fines ornamentales permite generar nuevas variedades comerciales con características novedosas que son demandadas por el mercado mundial de plantas decorativas. Estos mercados demandan variedades de plantas en función a sus características visuales (color, tamaño, forma) y sus características de resistencia o adaptación a diferentes condiciones climáticas (Hagiwara, 2016).

En 1998, se incorpora al mercado el género *Calibrachoa* con numerosas variedades de gran valor ornamental, principalmente por la variabilidad que presenta en características florales, tales como color y tamaño (Griesbach, 2006). En 1992, Suntory Flowers introduce la primera variedad comercial de *Calibrachoa* en el mercado (Smith, 2002), seguido por la aparición de numerosas variedades pertenecientes a empresas como Goldsmith Plants, Ball FloraPlant y Selecta First Class, entre otras. En nuestro país, los cultivares de *Calibrachoa* obtenidos por el Instituto de Floricultura de INTA fueron desarrollados a partir de germoplasma nativo proveniente de la provincia de Misiones. Las nuevas variedades ornamentales se caracterizan por florecer casi todo el año y son ideales para canteros y macetas (Hagiwara, 2016).

Si bien los cultivares comerciales de *Calibrachoa* son recientes, no deja de ser una de las plantas ornamentales más utilizadas y demandadas en los mercados internacionales como el de Estados Unidos, Europa y Japón (Hagiwara, 2016). Este género está ganando cada vez más espacio en los jardines de todo el mundo por sus características particulares: intensidad de color, el tamaño de sus flores y su apreciable belleza. A través de un acuerdo de licencia entre el INTA y la empresa norteamericana Proven Winners, líder en la producción y comercialización de plantas, se comercializa en el mercado internacional la variedad INTA-06575, cuyo nombre comercial es *Superbells Garden Rose* (Hagiwara, 2016). Esta planta fue desarrollada en el marco de un proyecto nacional de INTA, que busca obtener variedades ornamentales a partir de germoplasma nativo de la Argentina, en base al conocimiento, trabajo y tecnología nacional, con la vista puesta no sólo en el mercado local, sino también en el mercado internacional (Soto *et al.*, 2022).

Es importante destacar que el caso de variedades ornamentales se presenta como pionero en el uso de recursos fitogenéticos siguiendo los objetivos del Convenio de Biodiversidad y en la aplicación del Protocolo de Nagoya. Ambos acuerdos, a los cuales Argentina adhiere, proporcionan un marco jurídico para la aplicación efectiva de la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos. Específicamente el Protocolo de Nagoya, establece las obligaciones básicas para las partes contratantes que deben adoptar medidas en relación al acceso y a la distribución de beneficios y provee herramientas y mecanismos para facilitar su aplicación. Los programas de mejoramiento genético en plantas ornamentales, a partir de los recursos genéticos nativos en un marco de uso comercial sustentable, también promueven la conservación y utilización sostenible de la diversidad genética mediante la participación en los beneficios que surgen de la investigación y el desarrollo biotecnológico. La distribución tanto de beneficios económicos como no económicos favorece la transferencia de tecnología, el avance del sector científico nacional y la disminución de la brecha tecnológica existente a nivel mundial entre países (Soto *et al.*, 2022).

Luego de dos años de evaluación y mediante un convenio de transferencia de tecnología, Proven Winners obtuvo una licencia para multiplicar y vender el cultivar en los Estados Unidos y Canadá, por un tiempo establecido de cinco años. Las regalías recibidas a través la empresa por la venta del cultivar son compartidas con Misiones, provincia en la cual se recolectó la *Calibrachoa caesia* que dio origen a la variedad mejorada (Hagiwara, 2016).

Bajo este panorama el género *Calibrachoa* se torna atractivo para ser utilizado como fuente génica de sus características sobresalientes hacia otros géneros como *Petunia*. Otro aspecto interesante relevado en las especies de este género es que, aunque son perennes, presentan características de plantas de ciclo anual. Wilkins & Anderson (2006) hacen referencia a la importancia de las especies herbáceas que conjugan características de especies de ambos ciclos. El hecho de que sean perennes les otorga durabilidad en los jardines, lo que evita tener que renovarlas todos los años obteniendo bajos costos de mantenimiento (Wilkins & Anderson, 2006). Estas ventajas se conjugan con características frecuentes en plantas de ciclo anual como corto período juvenil, baja altura y bajos requerimientos nutricionales (Wilkins & Anderson, 2006).

Dado que el género *Petunia* no se cruza en forma directa con el género *Calibrachoa*, la detección y utilización de plantas puente entre ambos géneros podrían constituir una importante herramienta de mejoramiento para poder delinear el siguiente objetivo general e hipótesis:

OBJETIVO GENERAL

Hallar las combinaciones intermedias compatibles entre los parentales de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* que no se cruzan en forma directa.

HIPÓTESIS

Es posible la obtención de híbridos puente que permitan la exitosa realización de cruzamientos intergenéricos entre los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

CAPÍTULO I



CAPITULO I

Estudio de las relaciones de compatibilidad en cruzamientos intergenéricos entre especies del género *Calibrachoa* y *Petunia*

INTRODUCCIÓN

En los cultivos ornamentales la hibridación interespecífica e intergenérica es considerada como el recurso más importante para la obtención de variación genética (Afkhami-Sarvestani *et al.*, 2012; Van Tuyl & De Jeu, 2005; Horn, 2002). En efecto, los cruzamientos interespecíficos fueron herramientas básicas en programas de mejoramiento de cultivos tales como *Rosa* L., *Chrysanthemum* L., *Lilium* L., *Gladiolus* L., *Delphinium* L., *Freesia* Eckl. ex Klatt., *Hippeastrum* Herb. y *Alstroemeria*, entre otros (Datta, 2019). Si bien la hibridación se presenta como una técnica utilizada en mejoramiento, la obtención de híbridos interespecíficos, y en mayor medida intergenéricos, ha estado muchas veces limitada por diferentes barreras de incompatibilidad (De Souza *et al.*, 2017; Nettancourt, 2005), las cuales han sido identificadas primero y superadas después produciendo exitosamente germoplasma mejorado (Perschina & Trubacheeva, 2017).

Particularmente, la familia *Solanaceae* ha sido muy estudiada en aspectos vinculados con las barreras de incompatibilidad para la obtención de numerosos híbridos interespecíficos e intergenéricos (Piosik *et al.*, 2019; Cara *et al.*, 2019; Cremona *et al.*, 2018; Milicia *et al.*, 2016). Para el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), se utilizaron géneros vinculados a la especie que fueron hibridados exitosamente con la utilización de diferentes técnicas, como polinización en estado de botón floral y cultivo *in vitro* de embriones (Sharma *et al.*, 2019). Asimismo, en la hibridación entre *Nierembergia* y *Calibrachoa*, estudios de compatibilidad estigma-estilo-grano de polen permitieron la utilización de técnicas para superar barreras de incompatibilidad precigóticas, logrando identificar padres putativos para la obtención de híbridos (Milicia *et al.*, 2016).

Otra herramienta útil para superar barreras de incompatibilidad consiste en la utilización de plantas puente (Jansky & Hamernik, 2009; Khrustaleva & Kik, 2000). Esta técnica utiliza un híbrido obtenido entre los géneros de interés para ser empleado como parental en cruzamientos futuros con especies de ambos géneros que en forma directa son incompatibles y que, generalmente, presentan diferente nivel de ploidía. Dicha técnica fue utilizada exitosamente en el mejoramiento de

Solanum tuberosum L., *Tulipa gesneriana* L., *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. y *Allium cepa* L., entre otras especies de interés (Messmer *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2002; Van Eijk *et al.*, 1991; Estrada, 1990). Sin embargo, reportes sobre las bases moleculares, histoquímicas o citológicas que subyacen el éxito o el fracaso del uso de esta técnica, son escasos o inexistentes. Los antecedentes de trabajos sobre hibridación intergenérica a través de plantas puente, plantean dicha herramienta como una posibilidad para conjugar características favorables de los géneros *Petunia* ($2n=2x=14$) y *Calibrachoa* ($2n=2x=18$) (Chu *et al.*, 2014). En este marco, el primer paso a realizar es el estudio de la compatibilidad entre los géneros en la búsqueda de al menos una combinación que genere híbridos fértiles para ser utilizados como plantas puente en cruzamientos con el resto de las especies de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*. Resultados exitosos debido a la obtención de híbridos puente fueron encontrados en cruzamientos entre diferentes especies tuberosas del género *Solanum* (Jansky, 2009) y *Trifolium* L. (Hussain & Williams, 1997).

La corroboración de los híbridos se realiza a través de la cuantificación de ADN por citometría de flujo. Para el análisis se utiliza DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) como fluorocromo y luz ultravioleta, con una absorbancia de 350 nm (Johnston *et al.* 1999) y una emisión de 450 nm (Dolezel, 1994). Si bien este fluorocromo no puede ser usado para estimar el contenido de ADN, ya que se pega preferentemente a las bases adenina-timina (AT) (Kapuscinski, 1995), en estudios específicos puede ser usado para la identificación de niveles de ploidía, arreglos en las pares de bases y estructura de la cromatina en estudios específicos (Manzini *et al.* 1983). La selección de esta técnica se basó en lo reportado por Buitendijk *et al.* (1997) quienes identificaron con éxito híbridos interespecíficos en el género *Alstroemeria* usando citometría de flujo y DAPI como fluorocromo, mediante la obtención de valores intermedios en los promedios de fluorescencia.

En los híbridos putativos obtenidos es importante conocer su compatibilidad en cruzamientos puente con las especies de *Petunia* y *Calibrachoa* involucradas en el presente trabajo. En cuanto a la posibilidad de utilizarse como parentales masculinos, existen técnicas indirectas que permiten conocer la viabilidad del polen,

dada la sensibilidad de los gametos masculinos a las anormalidades citogenéticas que pueden derivar en semiesterilidad (Stelly *et al.* 1990). Además de su importancia para el mejoramiento de las plantas, el conocimiento de la fertilidad de los híbridos a través de la viabilidad del polen contribuye al entendimiento de las barreras reproductivas entre géneros y especies, y a conocer el efecto biológico de la domesticación y el aislamiento reproductivo artificial sobre la evolución de dichas barreras (Kaur & Singhal, 2019).

En los estudios de viabilidad y fertilidad de polen en distintas especies se utilizan diversos tipos de tinción. Algunos de ellos se basaron en colorantes nucleares como carmín propiónico (Whelan, 1982), citoplasmáticos como Buffalo Black NBR (Jackson, 1988) o diferenciales como el método de Alexander utilizado en este trabajo (Atlagic, 1996; Alexander, 1969). Dichos procedimientos detectan el polen no abortivo e indirectamente evalúan la viabilidad del mismo.

Una herramienta biotecnológica valiosa para apoyar el mejoramiento de plantas ornamentales son los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han demostrado ser útiles en la identificación de híbridos, variedades y productos de programas de mejoramiento genético en estados tempranos de desarrollo. Esto generalmente permite asegurar que los híbridos obtenidos en los ensayos son producto de las selecciones deseadas (Cárdenas Contreras, 2009).

Desde principios de siglo, la caracterización de los diferentes cultivos de interés ornamental se ha llevado a cabo con la ayuda de caracteres morfo-agronómicos y más recientemente con isoenzimas y proteínas de reserva. Las características morfológicas externas de las plantas fueron los primeros marcadores que se utilizaron y suelen ser habitualmente el primer paso de la identificación (Pérez de la Torre, 2011).

La aplicación de marcadores moleculares en floricultura ha permitido la caracterización de al menos 45 géneros de importancia ornamental. *Alstroemeria*, *Lilium*, *Gerbera* L., *Petunia*, *Pelargonium* L'Hér., *Chrysanthemum* y *Rosa*, son algunos de los géneros estudiados (Escandón *et al.*, 2010).

Entre los marcadores de efectiva utilización para la identificación varietal pueden citarse los microsatélites anclados o inter secuencias simples repetidas (Interspread single sequence repeats, ISSR), los cuales presentan la sensibilidad necesaria para distinguir entre individuos genéticamente próximos (Pérez de la Torre, 2011).

La técnica de ISSR fue aplicada satisfactoriamente en la identificación de cultivares como: *Solanum tuberosum* (Onamu *et al.*, 2016); *Oryza sativa* L. (Kiani y Katalani, 2018) y en especies de *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi (Saxena y Rukam, 2020), como así también en especies ornamentales de los géneros *Chrysanthemum* (Cid-Contreras *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2018), *Mecardonia Ruiz & Pav.* (Pérez de la Torre *et al.*, 2010), *Hydrangea* L. (Zhang y Sun, 2017), *Glandularia* (Salvi *et al.*, 2009), *Jacaranda* Juss. (Escandón *et al.*, 2005b y Pérez de la Torre *et al.*, 2003) y *Nierembergia* (Escandón *et al.*, 2007b; Pérez de la Torre *et al.*, 2006), en estos últimos, permitió determinar la variabilidad genética en poblaciones de ambos géneros.

En función de la problemática citada, el presente trabajo tiene como objetivo sentar las bases para la obtención de híbridos intergenéricos en los complejos *Calibrachoa* – *Petunia* a partir de la identificación de cruzamientos intermedios compatibles. Asimismo, propone investigar las bases mecanísticas que subyacen el proceso.

Los resultados obtenidos brindan información básica para poder ser aplicada en forma directa en los planes de mejoramiento llevados a cabo en el Instituto de Floricultura, dentro del marco del proyecto: “Mejoramiento genético de plantas ornamentales, aromáticas y medicinales, nativas y exóticas” (cartera de proyecto INTA 2019-2022), así como también para los proyectos de investigación aplicada de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNLZ): “Evaluación de la implementación de técnicas agroecológicas en el cultivo y mejora genética de especies hortícolas y florícolas” y “Mejoramiento y evaluación de plantas nativas sudamericanas de interés para el mercado ornamental global”.

OBJETIVOS

- Conocer el nivel de compatibilidad intergenérica entre las siguientes especies de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*: *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell., *P. inflata* R.E. Fr, *P. interior* Ando & Hashim. y *P. axillaris* subsp. *axillaris*; y seis especies correspondientes al género *Calibrachoa*: *C. linoides* (Hook.) Wijsmann, *C. ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir, *C. thymifolia* (A. St.-Hill.) Stehmann & Semir, *C. caesia* (Sendth.) Wijsmann, *Calibrachoa x hybrida* var. *Kabloom blue* y *C. x hybrida* var. *Kabloom yellow*.
- b) Obtener híbridos intermedios que permitan combinar en forma indirecta características de las especies de *Calibrachoa* y *Petunia* que no se cruzan en forma directa.
- c) Superar barreras de incompatibilidad intergenéricas por medio de la utilización de híbridos puente en el complejo *Calibrachoa* - *Petunia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de híbridos puentes putativos

1.1. Cruzamientos

Para la obtención de híbridos fueron realizados cruzamientos intergenéricos dirigidos entre cuatro especies nativas correspondientes al género *Petunia*: *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell (Cod. IF: 20060920C), *P. inflata* R.E. Fr (Cod. IF: 20060920F), *P. interior* Ando & Hashim. (Cod. IF: 200320b2) y *P. axillaris* subsp. *axillaris* (Cod. IF: 20060919E) (Fig.1); cuatro especies nativas correspondientes al género *Calibrachoa*; *C. linoides* (Hook.) Wijsmann (Cod. IF: 20081102B), *C. ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir (Cod. IF: 20081131A), *C. thymifolia* (A. St.-Hill.) Stehmann & Semir (Cod. IF: 20181022b1) y *C. caesia* (Sendth.) Wijsmann (Cod. IF: 20081111F) y dos variedades comerciales correspondientes al género *Calibrachoa*: *C. x hybrida* var. Kabloom blue y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow como parentales para la obtención de híbridos puente (Fig. 2).



Figura 1. Especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- *P. integrifolia*. b- *P. interior*. c- *P. inflata*. d- *P. axillaris*. Barras= 2,5 cm



Figura 2. Especies nativas y comerciales de *Calibrachoa* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- *C. caesia*. b- *C. ovalifolia*. c- *C. linoides*. d- *C. thymifolia*. e- *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. f- *C. x hybrida* var. Kabloom blue. Aumento: barras= 2,5 cm

Se realizaron cruzamientos dirigidos involucrando genotipos selectos según su valor ornamental. Para las especies de *Petunia* se utilizaron tres genotipos selectos y para las especies de *Calibrachoa* uno. Para cada combinación evaluada se efectuaron al menos diez cruzamientos, utilizando cada genotipo como parental masculino y femenino. Los mismos se llevaron a cabo utilizando gineceos provenientes de pimpollos emasculados y polen fresco. La emasculación fue realizada previa a la polinización. Los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras juntamente con la corola. El polen, extraído de flores en anthesis del progenitor masculino, fue inmediatamente depositado sobre el estigma de los pimpollos. La polinización fue realizada durante el mediodía.

La compatibilidad entre cada combinación fue evaluada a través de la tasa de fructificación (TF) definida como el número de frutos formados cada diez flores polinizadas o cruzamientos intergenéricos realizados. Como testigos se utilizaron cruzamientos intraespecíficos compatibles. La tasa de fructificación se expresa en porcentaje. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de diferencia de proporciones basadas en la distribución exacta del estadístico de Fisher, según

corresponde con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008). Las pruebas estadísticas que mostraron valor $P < 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

En cada cruzamiento dirigido realizado se aguardó el posible desarrollo de frutos y semillas.

1.2. Siembra de semillas híbridas y cultivo de las plantas obtenidas

Para la siembra de todas las semillas se llevó a cabo el mismo protocolo, previo a la siembra fueron sumergidas en ácido giberélico (100 ppm) durante 12 hs y luego fueron sembradas con sustrato estéril a base de turba:perlita:vermiculita (2:1:1) en contenedores de 8 cm de diámetro. Una vez formadas las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 10 cm de diámetro con el mismo tipo de sustrato. Las etapas de siembra y cultivo se realizaron en los invernáculos del Instituto de Floricultura del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA), INTA (34° 36' latitud S, 58° 40' longitud O) (Fig.3).



Figura 3. Invernaderos y mesadas con ejemplares cultivados.

Dentro del manejo de invernáculo se realizó control sanitario a partir del monitoreo previo para detectar la presencia de plagas y enfermedades. Cuando fue necesario se realizaron aplicaciones de insecticida y acaricida orgánico (mezcla de ésteres vegetales y jabón, Agri Star) y fungicida (Carbendazim, Brometan).

Se aplicó una fertilización sistemática del sustrato con NPK 43:26:45 ppm una vez por semana. La forma de aplicación fue fertirriego utilizando dosificadores hidráulicos (Dosatron).

Se aguardó la germinación de al menos alguna de las semillas híbridas obtenidas y, una vez desarrolladas las plantas, se realizó la caracterización morfológica de las mismas. Alcanzado el estado de floración, se realizaron cruzamientos puente con las especies parentales, utilizando los materiales híbridos como parentales masculinos y femeninos.

1.3. Propagación agámica de híbridos obtenidos

Los híbridos obtenidos fueron propagados agámicamente, cortando esquejes de 4-5 cm de longitud. El material fue puesto a enraizar en macetas bols de 15 cm de diámetro con sustrato de turba:perlita:vermiculita 1:1:1 (v/v), bajo condición de microaspersión con una frecuencia de 10 segundos cada 5 minutos y temperaturas de 25-35 °C . En cada maceta se colocaron 12 esquejes. Para facilitar el enraizamiento se utilizó hormona a base de ácido indol butírico 1000 ppm. Una vez enraizados fueron trasplantados a macetas de plástico y cultivados de la misma manera que las plantas provenientes de la propagación por semillas.

2. Identificación de híbridos

2.1. Estudios por citometría de flujo

Se analizó el contenido de ADN de las especies progenitoras y de la progenie híbrida.

Para la extracción de núcleos fueron picados 20 mg de hoja fresca de la muestra y la misma cantidad del estándar, en forma conjunta con 0,5 ml del buffer de Otto I (Tabla 1) dentro de una caja de Petri de vidrio. Posteriormente, la suspensión de núcleos fue pasada por un filtro de nylon de 30 µm y vertida sobre el tubo receptor plástico, al cual se le adicionó 2 ml de buffer de tinción Otto II (Tabla 1) con DAPI (4 mg/ml) (Otto, 1990).

Todas las muestras fueron analizadas con un equipo de citometría de flujo Modelo Partec PA (software Partec GmbH Alemania) con una lámpara HBO 100 W/2. Los

parámetros del equipo fueron fijados en una ganancia de 310, una lectura de 0 hasta 999 y una velocidad de flujo de 2 µl/s.

El análisis se realizó mediante tres repeticiones separadas en el tiempo de cada planta evaluada con tres lecturas para cada repetición (Dolezel & Bartos, 2005).

Para la cuantificación de ADN fue calculada la intensidad relativa de fluorescencia (IRF) (Mishiba *et al.* 2000), la cual reflejó el contenido relativo de ADN nuclear de las muestras respecto del patrón y correspondió al cociente entre las medias de intensidad de fluorescencia de la muestra (divisor) y la del estándar interno o patrón (dividendo).

Tabla 1: Preparación de los buffers utilizados para el análisis de ADN por citometría de flujo.			
Buffer Otto I		Buffer Otto II	
Ácido cítrico monohidratado 0,1M	4.2 g	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	28.65g
Tween 20 0,5% v/v	1 ml		
Llevar a 200 ml de volumen final, filtrar el buffer con un filtro 0,22 μm y conservar a 4 °C.		Llevar a 200 ml de volumen final, filtrar el buffer con un filtro 0,22 μm y conservar a temperatura ambiente.	
Fuente Otto, 1990			

2.2. Estudios por viabilidad del polen híbrido

La fertilidad de las plantas híbridas fue evaluada mediante la observación de granos de polen abortados. Para el recuento de la cantidad de polen abortado y no abortado fue realizada una tinción diferencial (Alexander, 1969). Para el análisis se colectaron granos de polen provenientes de flores en estado de antesis. Los mismos fueron colocados sobre un porta-objeto con una gota de la solución de tinción durante 15 minutos. La esterilidad del polen está asociada a granos de polen teñidos de color verde claro y la viabilidad a granos de polen teñidos de color rojo. El porcentaje de polen fértil se determinó sobre un total de 400 granos.

2.3. Estudios moleculares

Extracción, purificación y cuantificación de ADN

El ADN total se extrajo a partir de 30-40 mg de hojas jóvenes liofilizadas siguiendo el protocolo de Pérez de la Torre, *et al.* (2010) dejando actuar el *buffer* CTAB durante 2 h a 65 °C en agitación constante.

Las proteínas y restos de componentes celulares se eliminaron por adición de cloroformo:octanol (24:1) y posterior precipitación con isopropanol frío y centrifugación a 4 °C, recuperando el sobrenadante.

El ARN fue removido por digestión con la enzima Ribonucleasa pancreática bovina tipo I-A (0,1 µg/ml) (Sigma). Las impurezas remanentes fueron extraídas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y los restos de fenol fueron eliminados con cloroformo:octanol (24:1). El ADN presente en el sobrenadante fue reprecipitado con isopropanol frío, cloruro de sodio 5M (5 %) y centrifugación a 4 °C.

Luego de 2 lavados con etanol 70 %, el pellet obtenido se resuspendió en cantidad suficiente de *buffer* TE 1X hasta su disolución total. (Ver protocolo completo en Anexo I-B).

Las muestras de ADN se conservaron a -20 °C.

La concentración y pureza del ADN obtenido se verificó en un gel de agarosa (TAE 1X) al 0,8% teñido con bromuro de etidio (0,01 mg/ml) y se cuantificó por comparación con el marcador de peso molecular λ cortado con la enzima *Hind* III (Pb-L, UNQ).

Amplificación del ADN

Se utilizaron 13 iniciadores ISSR (Tabla 2), descritos por la UBC, Jain *et al.*, (1999) y Blair *et al.*, (1999).

Tabla 2: Iniciadores ISSR utilizados en las reacciones de PCR.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Referencia
5'CT	CCCGGATCC(CT)9	Blair <i>et al.</i> 1999
5'CA	CCCGGATCC(CA)9	Blair <i>et al.</i> 1999
5'GT	CCCGGATCC(GT)9	Blair <i>et al.</i> 1999
5'GA	CCCGGATCC(GA)9	Blair, <i>et al.</i> 1999
5'GACA	TC(GACA)4	Jain <i>et al.</i> 1999
3'CAC	(CAC)5GT	Jain <i>et al.</i> 1999
3'CAG	(CAG)5AT	Jain <i>et al.</i> 1999
3'GGG	GGG(TGGGG)2G	UBC
3'GA	(GA)9T	Blair <i>et al.</i> 1999
3'AG	(AG)8C	UBC
3'AC	(AC)8G	UBC
3'TG	(TG)8A	UBC
3'TC	(TC)8A	UBC

Ajuste de las condiciones de reacción

Las reacciones de amplificación, para cada iniciador, se llevaron a cabo con volúmenes de 3 mM de cloruro de magnesio. Para los iniciadores B, C, E, F, G, H, I, J, K, y L se utilizaron 2 µl mientras que para los iniciadores A, D y M se utilizaron

2,5 µl. Los valores de temperatura se tomaron teniendo en cuenta las temperaturas utilizadas en trabajos previos del laboratorio con los mismos iniciadores (Escandón *et al.*, 2005c).

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µl, conteniendo los siguientes componentes (Tabla 3).

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O ultra pura	12,9-13,4 µl
Buffer de reacción 10X (Inbio Highway)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Inbio Highway)	2,0-2,5 µl
Mix de dNTPs (1,25 mM de c/u) (Inbio Highway)	4,0 µl
Iniciador (20 µM) (Qiagen Operon)	1,0 µl
Taq polimerasa (5U/µl) (Inbio Highway)	0,1 µl
ADN (15 ng/µl)	2,0 µl

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador BioRad (My Cycler) (Fig.5) bajo las condiciones de amplificación que se muestran esquemáticamente en la Figura 4.



Figura 4. Esquema del programa utilizado en el termociclador My Cyclor de BioRad.

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa-TAE 1X al 3%, cargando 10 µl de una mezcla que contiene 8 µl del producto de reacción y 2 µl de *buffer* de siembra 3X (Azul de bromofenol 0,25 %, Glicerol 50 %, Tris-HCl 10mM, pH: 7,5, EDTA 50 mM. Biodynamics), los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,05 mg/ml), corridos a 80 volt por 180 min y documentados con el sistema de fotografía Doctt® de UVP (Fig. 5). Las bandas obtenidas fueron estimadas (en pares de bases -pb-) por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (PB-L, UNQ).

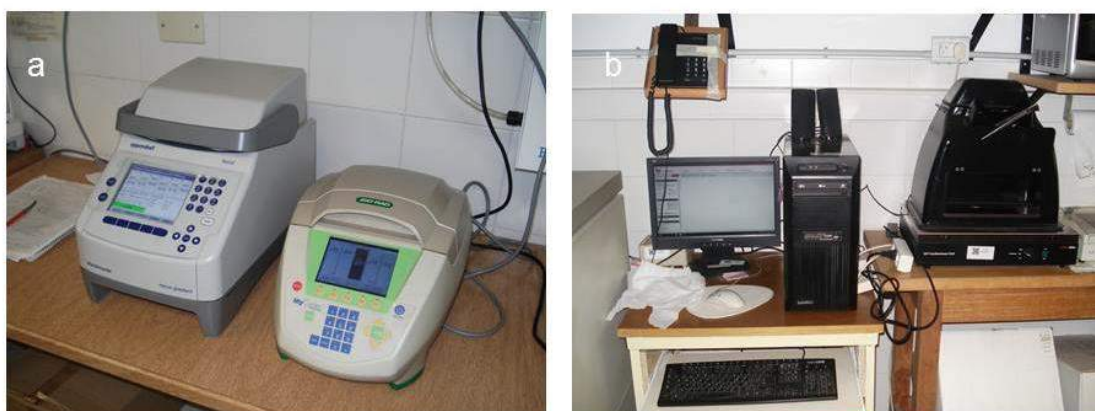


Figura 5. Equipamiento utilizado para estudios moleculares. a) Termociclador My Cyclor de BioRad. b) Sistema de fotografía Doctt® de UVP.

Para evaluar la reproducibilidad del perfil de bandas obtenido, tanto la extracción de ADN como las reacciones de PCR se efectuaron 3 veces. Para el análisis sólo se consideraron aquellas bandas claramente definidas, independientemente de su intensidad. Las bandas con igual migración fueron consideradas como fragmentos idénticos. El análisis de los perfiles de amplificación se realizó visualmente.

RESULTADOS

1. Obtención de híbridos puentes putativos

La tasa de fructificación (TF) mostró resultados variables para cada combinación. Debido a que no se hallaron diferencias significativas para los 3 genotipos utilizados dentro de cada especie del género *Petunia*, se tomaron valores promedio de estos para luego compararlos con el estadístico de diferencia de proporciones en las diferentes combinaciones con las especies de *Calibrachoa* (Anexo I- A).

1.1 Cruzamientos

1.1.1. Cruzamientos utilizando *Petunia integrifolia* como parental femenino

Los mejores resultados se obtuvieron de los cruzamientos *P. integrifolia* x *C. caesia*, *P. integrifolia* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y Kabloom blue, donde no se mostraron diferencias significativas con el testigo, presentando un 80 % de tasa de fructificación en la primera combinación y 100 % de tasa de fructificación en las dos últimas (Tabla 1) (Fig. 1). La combinación de *P. integrifolia* x *C. thymifolia* presentó diferencias significativas con el testigo, presentando un 50 % de tasa de fructificación (Tabla 1.1) (Fig. 1.1).

No se obtuvo producción de frutos en la combinación de *P. integrifolia* x *C. ovalifolia* y *P. integrifolia* x *C. linoides* por lo que la tasa de fructificación expresada en porcentaje fue 0 %, en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. integrifolia* x *P. integrifolia* donde la tasa de fructificación fue de 100 % (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Tasa de Fructificación TF (%)
(Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).

<i>P. integrifolia</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. linoides</i>	0 (0/10)	a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. thymifolia</i>	50 (5/10)	a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. caesia</i>	80 (8/10)	b
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. yellow	100 (10/10)	b
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. blue	100 (10/10)	b
<i>P. integrifolia</i> x <i>P. integrifolia</i>	100 (10/10)	b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).



Figura 1.1. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- *P. integrifolia* x *C. thymifolia*. b- *P. integrifolia* x *C. caesia*. c- *P. integrifolia* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.

1.1.2. Cruzamientos utilizando *Petunia inflata* como parental femenino

En las combinaciones de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow, *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom blue y *P. inflata* x *C. caesia* no se encontraron diferencias significativas con el testigo, debido a que la tasa de fructificación fue de 100 % en los primeros dos casos y 90 % en el tercero (Tabla 1.2) (Fig. 1.2).

El cruzamiento de *P. inflata* x *C. thymifolia* presentó diferencias significativas con el testigo, presentando un 40 % de tasa de fructificación (Tabla 2).

No se produjo formación de frutos en las combinaciones de *P. inflata* x *C. ovalifolia* y *P. inflata* x *C. linoides*, por lo que el porcentaje de tasa de fructificación fue 0 % en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. inflata* x *P. inflata* donde el porcentaje de tasa de fructificación fue 100 % (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Tasa de fructificación TF (%)
(Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).

<i>P. inflata</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. inflata</i> x <i>C. linoides</i>	0 (0/10)	a
<i>P. inflata</i> x <i>C. thymifolia</i>	40 (4/10)	a
<i>P. inflata</i> x <i>C. caesia</i>	90 (9/10)	b
<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. yellow	100 (10/10)	b
<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. blue	100 (10/10)	b
<i>P. inflata</i> x <i>P. inflata</i>	100 (10/10)	b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).



Figura 1.2. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- Frutos de *P. inflata* x *C. caesia*. b- Fruto con dehiscencia de *P. inflata* en cruzamiento testigo (*P. inflata* x *P. inflata*). Aumento: barras= 4 mm

1.1.3. Cruzamientos utilizando *Petunia axillaris* como parental femenino

La producción de frutos para la combinación de *P. axillaris* con *C. ovalifolia*, *C. linoides*, *C. thymifolia*, *C. caesia* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y var. Kabloom blue fue nula en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. axillaris* x *P. axillaris*, por lo que el porcentaje de tasa de fructificación fue 0 % (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Tasa de fructificación TF (%)
(Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).

<i>P. axillaris</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>C. linoides</i>	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>C. thymifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>C. caesia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. yellow	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. blue	0 (0/10)	a
<i>P. axillaris</i> x <i>P. axillaris</i>	100 (10/10)	b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

1.1.4. Cruzamientos utilizando *Petunia interior* como parental femenino

Los mejores resultados se obtuvieron de los cruzamientos *P. interior* x *C. caesia*, *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y Kabloom blue donde no se encontraron diferencias significativas con el testigo de *P. interior* x *P. interior*, presentando un 100 % de tasa de fructificación en los primeros dos casos y 80 % en el tercero (Fig. 1.3).

Para las combinaciones de *P. interior* x *C. ovalifolia*, *C. linoides* y *C. thymifolia* no se observó desarrollo de frutos (Tabla 1.4).

Tabla 1.4: Tasa de fructificación TF (%)
(Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas).

<i>P. interior</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. interior</i> x <i>C. linoides</i>	0 (0/10)	a
<i>P. interior</i> x <i>C. thymifolia</i>	0 (0/10)	a
<i>P. interior</i> x <i>C. caesia</i>	100 (10/10)	b
<i>P. interior</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. yellow	100 (10/10)	b
<i>P. interior</i> x <i>C. x hybrida</i> var. K. blue	80 (8/10)	b
<i>P. interior</i> x <i>P. interior</i>	100 (10/10)	b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

1.1.5. Cruzamientos utilizando *Calibrachoa* como parental femenino

Cuando las distintas especies de *Calibrachoa* fueron utilizadas como parental femenino no se observó desarrollo de frutos por lo que la tasa de fructificación fue de 0 %.



Figura 1.3. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- Frutos con dehiscencia de *P. interior* x *C. caesia*. b- Fruto inmaduro de *P. interior* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. Aumento: barras= 3 mm

1.2. Obtención y cultivo de plantas híbridas

Producto de la siembra de las semillas conseguidas en los cruzamientos intergenéricos mencionados, se obtuvo una única plántula híbrida en la combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow (Fig. 1.4).

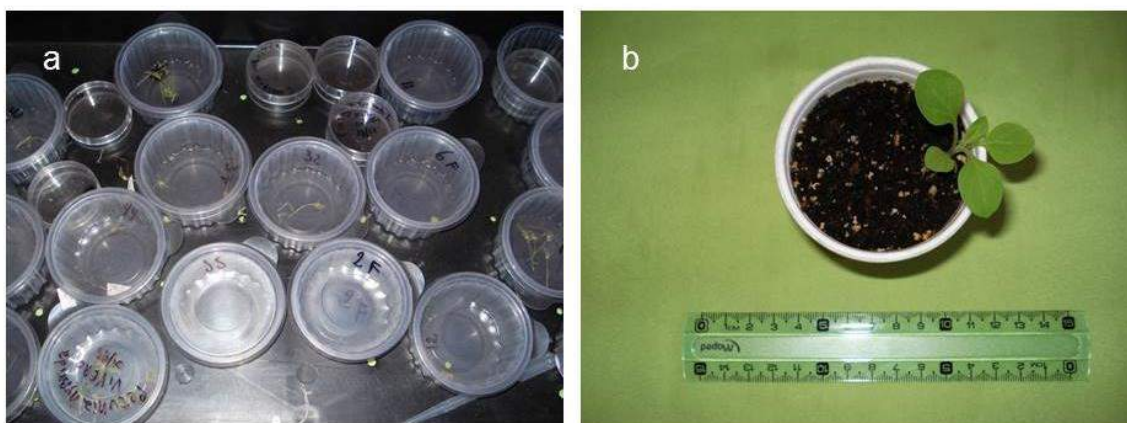


Figura 1.4. Colección de semillas y plántula híbrida obtenida. a- Recolección de semillas provenientes de los cruzamientos intergenéricos realizados. b- Plántula híbrida proveniente del cruzamiento de *Petunia inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.

Caracterización morfológica del híbrido puente y sus parentales

El híbrido obtenido entre *Petunia* y *Calibrachoa* (HPC) presenta las siguientes características morfológicas: hierba anual de hasta de 40 cm de alto, erecta al inicio del desarrollo luego presenta ramificaciones basales con tallos decumbentes y ascendentes; tallos cilíndricos, glanduloso-pilosos. Hojas basales con pecíolo de hasta 15 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 34-55 x 15-35 mm, elípticas, angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, decurrente formando un falso pecíolo, densamente glandular-pilosa, membranácea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 28-33 mm, ascendentes, glandular-pilosos; cáliz formado por cinco sépalos con lóbulos de 8-10 x 2 mm, verdosos, linear-oblongos, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 25-30 mm de longitud, campanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, limbo de 28-33 mm de diámetro, con lóbulos suborbiculares, ápices obtusos; filamentos adnatos 2,5-4,5 mm a la base de la corola, el menor de 7-10 mm, el par mediano de 11-13 mm y el par mayor de 12-15 mm, anteras de 1-1,5 mm, abriéndose completamente, polen amarillo; ovario de 1.8-2,2 mm, cónico, estilo de 9-11 mm, estigma dilatado, obcónico (Fig. 1.5 y 1.6) (Tabla 1.5).



Figura 1.5. Morfología del híbrido HPC. a- Vástago con flores. b y d- Detalle de la flor. c- Planta cultivada en cantero al aire libre.

Petunia inflata es una hierba anual de hasta de 50 cm de alto, erecta al inicio del desarrollo, después con muchas ramificaciones basales con tallos decumbentes y ascendentes; tallos cilíndricos, glanduloso-pilosos, variables en longitud. Hojas basales con peciolo de hasta 18 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 50-65 x 10-37 mm, elípticas, angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, decurrente formando un falso peciolo, esparcida a densamente glandular-pilosa, membranácea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 8-20 mm, ascendentes, glandular-pilosos; cáliz con tubo de 2-3 mm, purpúreo, lóbulos de 6-10 x 1 mm, verdosos, linear-oblongos o linear-oblancheolados, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 23-30 mm de longitud por 25-30 mm de diámetro, campanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta

purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, con lóbulos suborbiculares, de ápice agudo; filamentos 2,5-4,5 mm a la base de la corola, el menor libre de 5,5-6 mm, el par mediano de 6-7 mm y el par mayor de 9-12 mm, anteras de 1,5-2 mm, abriéndose completamente, polen violáceo; ovario de 2-3 mm, cónico, estilo de 8-11 mm, estigma dilatado, obcónico; cápsula ovoide de 6-7,5 x 4-5 mm, castaño-clara; cáliz fructífero por lo menos dos veces mayor que la cápsula; pedicelo fructífero de 10-26 mm, siempre ascendente, recto o ligeramente curvo; semillas numerosas, subglobosas (Fig.1.6) (Tabla 1.5).

Calibrachoa x hybrida var. Kabloom yellow:

Subarbusto pequeño, decumbente, perenne, tallos cilíndricos con indumento, piloso o subviloso, tricomas simples, glandulosos; hojas subsésiles, alternas, solitarias, a veces con fascículos de hojitas pequeñas en la axila de las hojas maduras debido a la presencia de braquiblastos, lámina entera 14-18 x 4-5 mm, membranácea, linear-espatulada, oblonga, ápice obtuso, cuneada, margen entero, nervadura primaria, impresa en la cara adaxial, prominente en la cara abaxial, nervaduras secundarias en general no evidentes. Inflorescencia terminal, primera ramificación en general dicotómicamente ramificada, después monocasial, formada por una secuencia de unidades simpodiales con una flor axilar y un par de brácteas foliosas opuestas en cada nudo; pedúnculos suberectos 7-10 mm, indumento siempre presente. Flores pentámeras, simetría floral zigomorfa; cáliz formado por cinco sépalos 9-11 x 2 mm hendido hasta la mitad de su longitud; tubo campanulado, lóbulos angostándose en dirección al ápice; corola campanulada-infundibuliforme, color amarilla con venación más o menos intensa y nervios principales a prominentes exteriormente, base subcilíndrica, garganta circundada por un anillo amarillo más o menos definido, tubo penta-lobado de 18-25 de longitud

x 23-25 mm de diámetro, lóbulos de ápice obtuso; estambres heterodínamos, un par mayor 12-16mm, un par mediano 10-14 mm y un estambre menor 8-12 mm, filamentos filiformes, de ápice más o menos curvo, glabros, base adnata al tubo corolino, anteras ovadas, dehiscencia longitudinal, amarillas; ovario súpero, bicarpelar, bilocular, multiovulado, óvulos con placentación axilar, estilo filiforme 9-12 mm, con ápice levemente curvo, estigma bilobado, situado entre las anteras del par medio y mayor de estambres, pedúnculo fructífero recto o algo curvo; cáliz persistente, envolviendo a la cápsula; cápsula ovoide- globosa, septicida, 2-valvar, replum persistente, glabra; semillas numerosas, globosas (Fig.1.6) (Tabla 1.5).

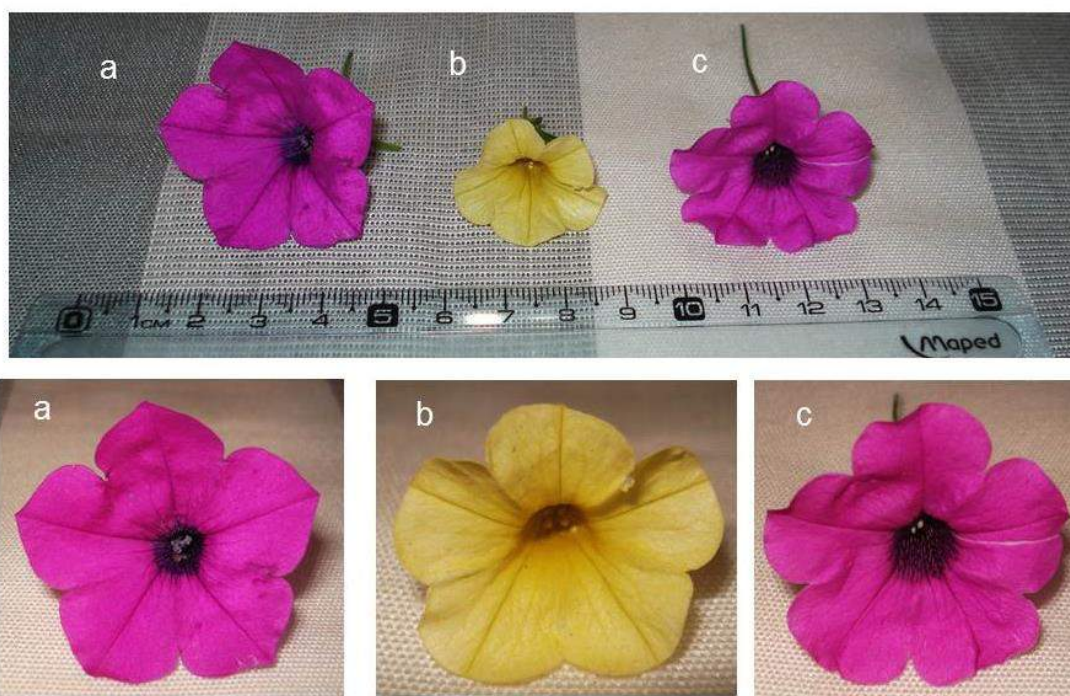


Figura 1.6. Características morfológicas de la flor del híbrido HPC y sus parentales. a- Detalle de la flor de *P. inflata*. b- Detalle de la flor de *C. x hybrida* var. kabloom yellow. c- Detalle de la flor de HPC.

El del híbrido HPC presenta características morfológicas compartidas con *P. inflata* y *C. x hybrida* var. kabloom yellow. De *Petunia* presenta características del vástago,

el color de flor púrpura y su tamaño, hábito de crecimiento herbáceo con ciclo anual en clima templado y de *Calibrachoa* presenta anteras de color amarillo, todos los estambres adnados a la corola y los lóbulos de la corola con ápice obtuso (Tabla 1.5).

Tabla 1.5: Características morfológicas sobresalientes de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* observadas en el híbrido puente HPC (*P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow).

Características morfológicas de <i>Petunia</i>	Características morfológicas presentes en HPC
Morfología del tallo y hojas	✓
Flores de color púrpura	✓
Hábito de crecimiento herbáceo	✓
Anteras de color violáceo	x
Estambres libres	X
Lóbulos de la corola con ápice agudo	X
Características morfológicas de <i>Calibrachoa</i> :	
Morfología del tallo y hojas	X
Flores de color amarillo	X
Anteras de color amarillo	✓
Estambres adnados a la corola	✓
Lóbulos de la corola con ápice obtuso	✓

2. Identificación de híbridos

2.1. Identificación del híbrido por citometría de flujo

La técnica de análisis celular para inferir el contenido de ADN en los parentales *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow, así como también del híbrido obtenido por el cruzamiento de los mismos, mostró una ubicación desfasada del híbrido hacia la derecha con respecto a las especies progenitoras, en lugar de encontrar contenidos intermedios de ADN como era de esperar. La existencia de cantidades similares de ADN entre los parentales no permitió confirmar por esta técnica la naturaleza del híbrido HPC (Fig.1.7)

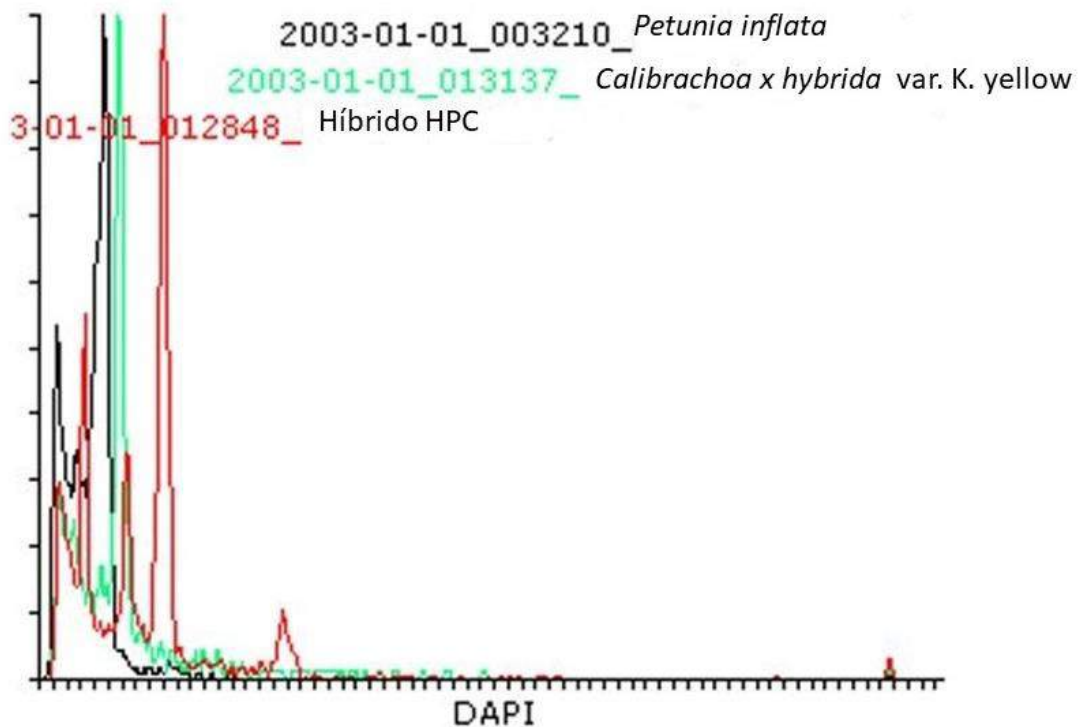


Figura 1.7. Histograma obtenido por citometría de flujo relacionando el número de núcleos analizados con la intensidad de fluorescencia de DAPI para los parentales *P. inflata*, *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y el híbrido HPC.

2.2. Estudios de viabilidad del polen híbrido

El 5 % de los granos de polen del híbrido HPC presentó una tinción de color rojo la cual indica la viabilidad de éstos, mientras que el 95 % restantes presentó una coloración verde típica de granos de polen no viables. Las especies parentales del híbrido, *P. inflata* y *C. x hybrida* var kabloom yellow, utilizadas como testigos, mostraron 96 % y 94 % de granos de polen viables teñidos de color rojo. El polen abortado aparece de color verde debido a que el verde de malaquita tiñe específicamente la pared celular, mientras el ácido fucsínico penetra las células vivas y colorea el citoplasma de rojo (Fig.1.8). Sin embargo, la presencia de polen inviable permite sumar evidencia a la naturaleza híbrida de HPC.

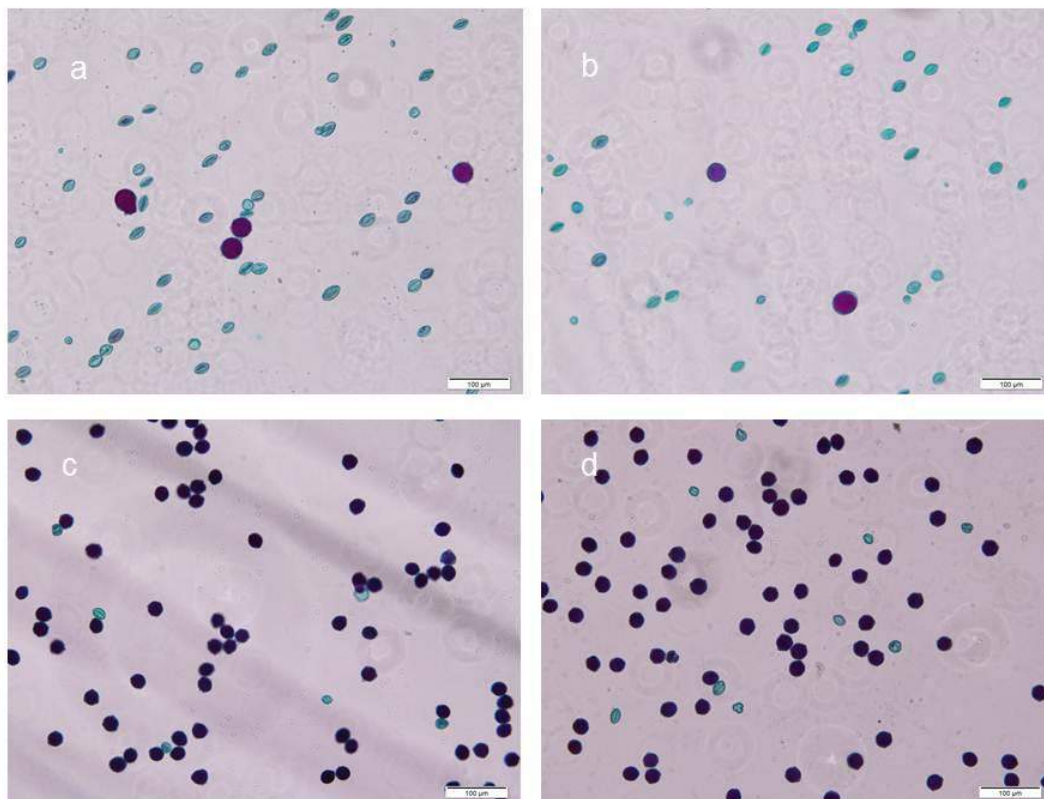


Figura 1.8. Tinción de granos de polen por método de Alexander. a y b.- granos de polen del híbrido HPC. c- Granos de polen de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. d- Granos de polen de *P. inflata*.

2.3. Estudios moleculares para la verificación del híbrido HPC.

Como resultado del protocolo de extracción utilizado, se obtuvo cantidad y calidad adecuada de ADN necesarias para las reacciones de amplificación. A partir de las concentraciones obtenidas se realizaron diluciones a fin de lograr las concentraciones óptimas para las reacciones de PCR.

Los perfiles de amplificación por PCR obtenidos en las corridas electroforéticas mostraron para la planta híbrida la presencia de bandas del parental femenino, mientras que las bandas del parental masculino se apreciaron en el iniciador 3'GA siendo de esta manera confirmada la verificación molecular del híbrido HPC.

Las Figura 1.9 muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de bandas obtenidos en el híbrido HPC y sus parentales.

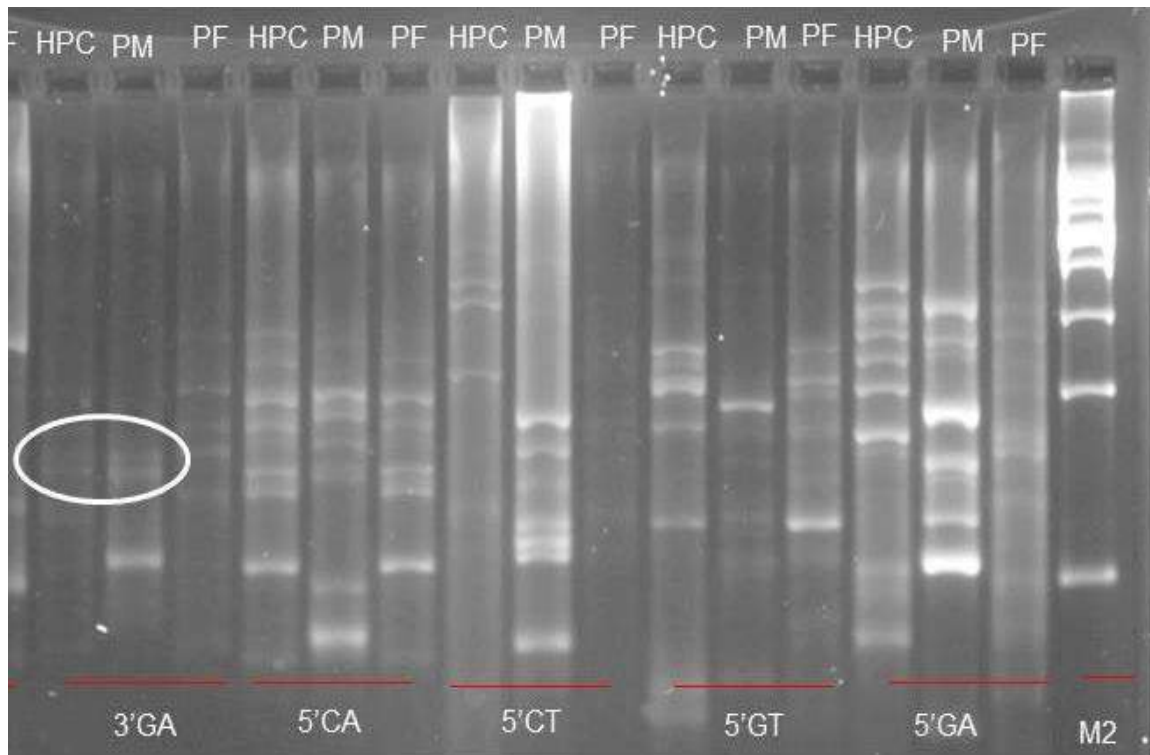


Figura 1.9. Perfiles de amplificación del híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow (HPC). Marcado de la zona donde se observa la banda del parental masculino en el híbrido. M2: marcador de peso molecular 400 bp. PM: parental masculino. PF: parental femenino.

3. Cruzamientos puentes con el género *Petunia*

La tasa de fructificación en los cruzamientos puente mostró resultados variables para cada combinación. La producción de frutos en la combinación de *P. integrifolia* y *P. inflata* con HPC fue exitosa presentando porcentajes de tasa de fructificación del 90 % y 100 %, respectivamente. Mientras que no fue exitosa para la combinación de *P. axillaris* x HPC y *P. interior* x HPC cuyo porcentaje de tasa de fructificación fue 0 % (Tabla 1.6).

Cuando HPC fue utilizado como parental femenino se obtuvieron porcentajes de tasa de fructificación del 70 % y 100 % para las combinaciones de HPC x *P. inflata* y HPC x *P. integrifolia*. Por el contrario, no fue exitosa la producción de frutos para

la combinación de HPC x *P. axillaris* y HPC x *P. interior* donde la tasa de fructificación fue 0 % (Tabla 1.7).

Tabla 1.6: Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental masculino y las especies de *Petunia* utilizadas.

Cruzamientos puente	<i>Petunia integrifolia</i>	<i>Petunia inflata</i>	<i>Petunia axillaris</i>	<i>Petunia interior</i>
Híbrido HPC (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	9/10 a	10/10 a	0/10 b	0/10 b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher (p<0,05).

Tabla 1.7: Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental femenino y las especies de *Petunia* utilizadas.

Cruzamientos puente	<i>Petunia integrifolia</i>	<i>Petunia inflata</i>	<i>Petunia axillaris</i>	<i>Petunia interior</i>
Híbrido HPC (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	10/10 a	7/10 a	0/10 b	0/10 b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher (p<0,05).

4. Cruzamientos puente con el género *Calibrachoa*

En los cruzamientos puente entre el híbrido HPC y las distintas especies de *Calibrachoa* involucradas se observaron diferentes resultados en función de la utilización de HPC como parental masculino o femenino.

En las combinaciones de HPC como parental femenino y *C. caesia*, *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y var. Kabloom Blue, se obtuvo 100 % de tasa de fructificación

(Tabla 8). Por lo contrario, las combinaciones de HPC con *C. ovalifolia*, *C. linoides* y *C. thymifolia* no obtuvo formación de frutos siendo su tasa de fructificación de 0% El porcentaje de tasa de fructificación fue de 0 % para todas las combinaciones de *Calibrachoa* con HPC como parental masculino (Tabla 1.9).

Tabla 1.8: Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental femenino y las especies del género *Calibrachoa* utilizadas.

Cruzamientos puente	<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	<i>Calibrachoa caesia</i>	<i>Calibrachoa linoides</i>	<i>Calibrachoa thymifolia</i>	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. K. yellow	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. K. blue
Híbrido (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	0/10 b	10/10 a	0/10 b	0/10 b	10/10 a	10/10 a

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher (p<0,05).

Tabla 1.9: Tasa de fructificación TF (%) (Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos puente entre el híbrido como parental masculino y las especies del género *Calibrachoa* utilizadas.

Cruzamientos puente	<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	<i>Calibrachoa caesia</i>	<i>Calibrachoa linoides</i>	<i>Calibrachoa thymifolia</i>	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. K. yellow	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. K. blue
Híbrido (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	0/10 a	0/10 a	0/10 a	0/10 a	0/10 a	0/10 a

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher (p<0,05).

Los frutos obtenidos en los cruzamientos puente mencionados anteriormente mostraron diferencia de tamaños comparados con los frutos formados en los cruzamientos intergenéricos iniciales y con los cruzamientos testigo (Fig. 1.9).

Los frutos formados en las combinaciones puente donde el híbrido HPC se utilizó tanto como parental masculino o como parental femenino, mostraron un diámetro transversal promedio de 3 mm, mientras que los frutos formados en los

cruzamientos intergenéricos mostraron diámetros en entre 4 y 6 mm al igual que los obtenidos en las combinaciones testigo.



Figura 1.10. Tamaño comparativo de los frutos obtenidos en los cruzamientos puente. a- Fruto de cruzamiento testigo de *P. inflata* x *P. inflata*. b- Fruto de cruzamiento de *P. inflata* x híbrido HPC. c-Detalle de fruto de *P. integrifolia* x híbrido HPC. d- Fruto de híbrido HPC x *P. inflata*. e- Fruto proveniente del cruzamiento intergenérico entre *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. Aumento: barras= 10 mm

Independientemente del tamaño de los frutos y del número de las semillas recolectadas por cada fruto proveniente de los cruzamientos puentes, la germinación de sus semillas mostró resultados variables. Se sembraron 50 semillas por combinación y se obtuvo germinación y desarrollo de plántulas normales en las combinaciones de HPC x *P. integrifolia* donde se obtuvieron 10 plántulas, HPC x *P.*

inflata donde se obtuvieron 9 plántulas y *P. inflata* x HPC donde se obtuvieron 12 plántulas. El resto de las combinaciones no presentaron semillas germinadas (Fig 1.10).

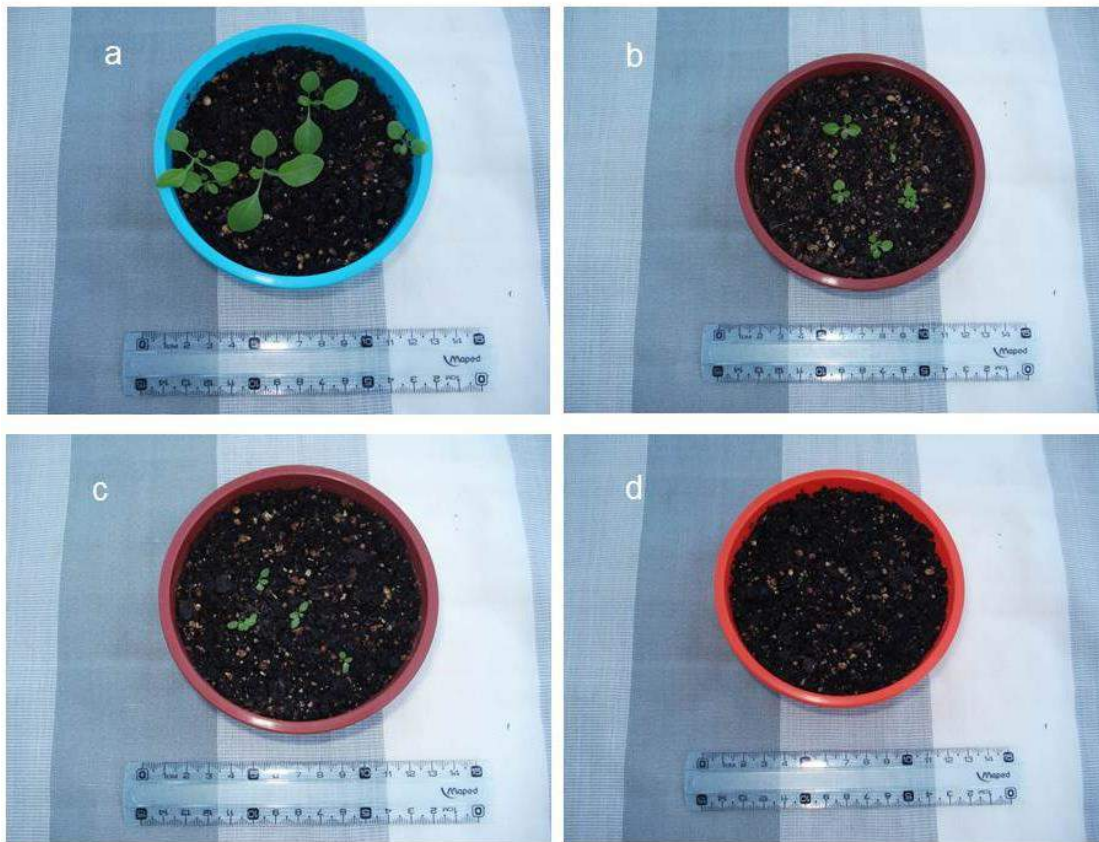


Figura 1.11. Plántulas obtenidas por la siembra de semillas obtenidas en los cruzamientos puente. a- Plántulas provenientes del cruzamiento de HPC x *P. integrifolia*. b- Plántulas provenientes del cruzamiento de HPC x *P. inflata*. c- Plántulas provenientes del cruzamiento de *P. inflata* x HPC. d- Ausencia de germinación en la siembra del cruzamiento de *P. integrifolia* x HPC.

Las plantas obtenidas en los cruzamientos puente entre *P. inflata* x HPC presentan las siguientes características morfológicas:

Hierba anual de hasta de 35 cm de alto, erecta al inicio del desarrollo luego presenta ramificaciones basales con tallos decumbentes y ascendentes; tallos cilíndricos, glanduloso-pilosos. Hojas basales con pecíolo de hasta 10 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 30-50 x 15-30 mm, elípticas,

angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, densamente glandular-pilosa, membranácea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 30-35 mm, ascendentes, glandular-pilosos; cáliz formado por cinco sépalos con lóbulos de 8-10 x 2 mm, verdosos, linear-oblongos, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 25-30 mm de longitud, campanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, limbo de 30-35 mm de diámetro, con lóbulos suborbiculares, ápices obtusos, filamentos adnatos 2,5-4,5 mm a la base de la corola, el menor de 8-10 mm, el par mediano de 11-13 mm y el par mayor de 12-16 mm, anteras de 1-1,2 mm, abriéndose completamente, polen amarillo; ovario de 1.8-2,0 mm, cónico, estilo de 9-11 mm, estigma dilatado, obcónico (Fig.1.11 y 1.12).



Figura 1.12. Plantas obtenidas en los cruzamientos puente de *P. inflata* x HPC. a- Planta cultivada en maceta. b- Detalle de la flor. c- Detalle de la garganta de la flor donde se observan las anteras con polen amarillo.

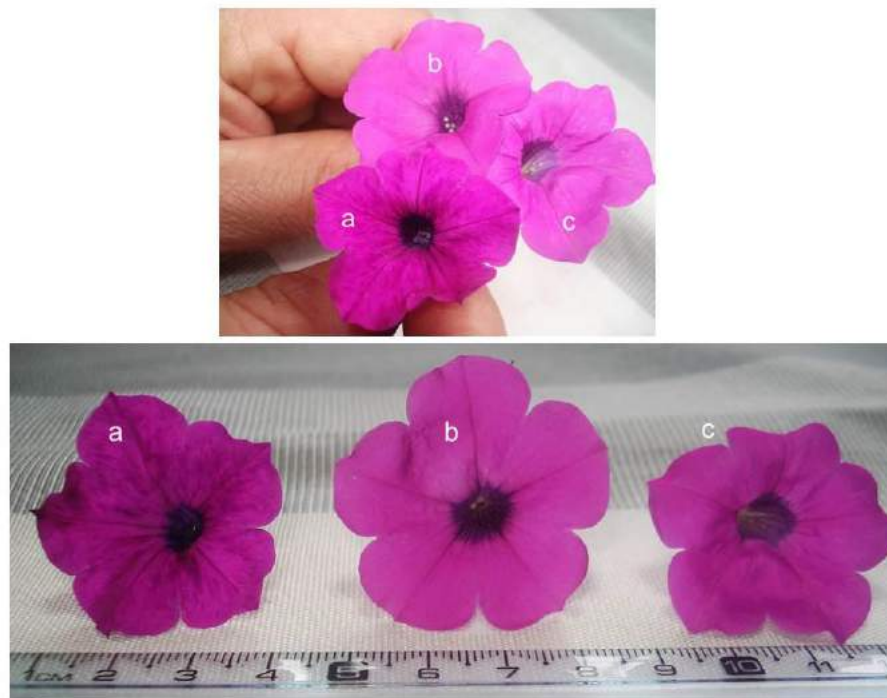


Figura 1.13. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre *P. inflata* x HPC y sus parentales. a- Detalle de la flor de *P. inflata*. b- Detalle de la flor de HPC. c- Detalle de la flor obtenida en el cruzamiento puente *P. inflata* x HPC.

Las plantas obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x *P. integrifolia* presentan las siguientes características morfológicas:

Hierba anual de hasta de 50 cm de alto, erecta al inicio del desarrollo luego presenta ramificaciones basales con tallos decumbentes y ascendentes; tallos cilíndricos, glanduloso-pilosos. Hojas basales con pecíolo de hasta 30 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 30-60 x 15-35 mm, elípticas, angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, densamente glandular-pilosa, membranacea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 30-35 mm, ascendentes, glandular-pilosos; cáliz formado por cinco sépalos con lóbulos de 8-10 x 2 mm, verdosos, linear-oblongos, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 30-35 mm de longitud, campanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, limbo de 30-35 mm de diámetro, con lóbulos suborbiculares, ápices obtusos, filamentos adnatos a la base

de la corola, el menor de 8-10 mm, el par mediano de 12-15 mm y el par mayor de 18-20 mm, anteras de 1-1,8 mm, abriéndose completamente, polen violáceo; ovario de 1.8-2,0 mm, cónico, estilo de 12-17 mm, estigma dilatado, obcónico (Fig.1.13).

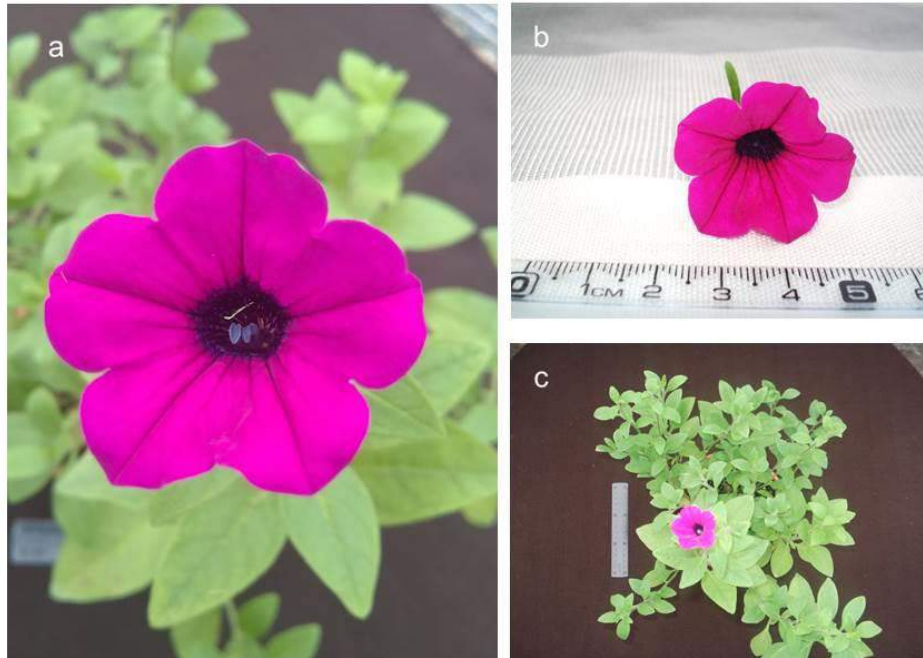


Figura 1.14. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x *P. integrifolia*. a y b- Detalle de la flor. c- Estructura de la planta al inicio de floración.

Las plantas obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x *P. inflata* presentan las siguientes características morfológicas:

Hierba anual de hasta de 30 cm de alto, erecta con muchas ramificaciones basales con ascendentes; tallos cilíndricos, glanduloso-pilosos, variables en longitud. Hojas basales con peciolo de hasta 20 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 50-80 x 20-45 mm, elípticas, angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, decurrente formando un falso peciolo, esparcida a densamente glandular-pilosa, membranácea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 8-20 mm,

ascendentes, glandular-pilosos; cáliz con tubo de 2-3 mm, lóbulos de 6-10 x 2-3 mm, verdosos, linear-oblongos o linear-oblancheolados, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 25-30 mm de longitud por 25-30 mm de diámetro, campanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, con lóbulos suborbiculares, obtusos; filamentos adnatos 2,5-4,5 mm a la base de la corola, el menor de 5 -6 mm, el par mediano de 8-10 mm y el par mayor de 12 -15 mm, anteras de 1,5-2 mm, abriéndose completamente, polen violáceo; ovario de 2-3 mm, cónico, estilo de 8-11 mm, estigma dilatado, obcónico (Fig.1.14).



Figura 1.15. Características morfológicas de las flores obtenidas en los cruzamientos puente entre HPC x *P. inflata* y sus parentales. a- Detalle de la flor de HPC. b- Detalle de la flor de *P. inflata*. c y d- Detalle de la flor obtenida en el cruzamiento puente HPC x *P. Inflata*. e- c- Estructura de la planta al inicio de floración.

Las plantas obtenidas a través de los cruzamientos puente presentan características morfológicas compartidas con los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* (Tabla 1.10).

Tabla 1.10: Características morfológicas sobresalientes de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* observadas en el híbrido puente HPC (*P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow) y en las plantas obtenidas por los cruzamientos en que interviene.

Características morfológicas de <i>Petunia</i>	Características morfológicas presentes en HPC y en las plantas obtenidas por cruzamientos puente			
	HPC	<i>P. inflata</i> x HPC	HPC x <i>P. integrifolia</i>	HPC x <i>P. inflata</i>
Morfología del tallo y hojas	✓	✓	✓	✓
Flores de color púrpura	✓	✓	✓	✓
Hábito de crecimiento herbáceo	✓	✓	✓	✓
Anteras de color violáceo	x (amarillas)	x (amarillas)	✓	✓
Características morfológicas de <i>Calibrachoa</i>:				
Anteras de color amarillo	✓	✓	x (violáceas)	x (violáceas)
Estambres adnados a la corola	✓	✓	✓	✓
Lóbulos de la corola con ápice obtuso	✓	✓	✓	✓

DISCUSIÓN

A partir de las 240 combinaciones de taxones ensayadas se obtuvieron frutos en 94 de ellas. La tasa de fructificación y la producción de semillas en todos los cruzamientos realizados demuestran el variable nivel de compatibilidad intergenérica entre las especies involucradas de *Petunia* y *Calibrachoa*. Estos resultados indican que, si bien la hibridación intergenérica es una modalidad eficiente para generar variabilidad en el mejoramiento genético de estos géneros, la selección de los cruzamientos putativos adecuados es de gran importancia para la obtención de híbridos (Milicia *et al.*, 2016).

El éxito de los cruzamientos dirigidos no sólo radica en la formación de frutos y semillas, sino también en la capacidad de estas últimas para germinar y producir plántulas normales. En los cruzamientos entre *Petunia* y *Calibrachoa*, el 39 % del total de cruzamientos produjo frutos y semillas, pero sólo en la combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow se obtuvo la germinación y crecimiento de una planta híbrida. Resultados similares se obtuvieron en el mejoramiento genético de *Elaeis guineensis* Jacq. donde las semillas híbridas obtenidas presentaron problemas de baja germinación (Cuervo, 2006) o en cruzamientos interespecíficos entre *Solanum melongena* con *S. sisymbriifolium* y *S. torvum* donde no se desarrollaron embriones viables en forma natural (Plazas, 2014). De igual modo, Bugallo (2017) realizando cruzamientos interespecíficos con especies nativas de *Passiflora* encontró que, de un total de 24 cruzamientos, cinco no lograron producir híbridos por fallas en la germinación de las semillas. De nueve cruzamientos con *P. mooreana* Hook. que produjeron semillas, sólo dos germinaron. Este defecto en la germinación denota la existencia de una barrera poscigótica que puede provenir de diversos orígenes. Uno de ellos es la impronta genómica, “genomic imprinting”, que produce el “apagado” de una de las copias de varios genes y es fundamental en la función del endosperma para nutrir al embrión (Köhler *et al.*, 2021; Ali, 2016; Wolff *et al.*, 2015). Otro, deriva de una falla en la etapa de celularización durante el desarrollo del endosperma que deja sin alimento al embrión (Köhler *et al.*, 2021; Ali, 2016; Wolff *et al.*, 2015). Un tercero se da en híbridos donde se observan endospermas defectuosos, pero este fenómeno ocurre independientemente del

modo de desarrollo del endosperma (celular o nuclear) (Köhler *et al.*, 2021; Ali, 2016; Wolff *et al.*, 2015).

El híbrido obtenido por el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. kabloom yellow (híbrido intergenérico HPC) presenta características morfológicas pertenecientes a ambos parentales, no obstante, se realizó el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Si bien la citometría de flujo con DAPI es usada mayormente para detectar diferentes niveles de ploidía (Gamón Guillamón, 2020), estudios sobre la sensibilidad de la citometría de flujo en el genoma vegetal detectaron exitosamente estados de aneuploidía (Loureiro & Santos, 2004). Estos resultados permiten inferir que el análisis por citometría de flujo de los híbridos entre *Petunia* y *Calibrachoa* detectaría pérdidas o ganancias de cromosomas por desbalance en la meiosis de los híbridos (Soto, 2007). La citometría de flujo permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo, con un alto nivel de repetitividad. Si las especies utilizadas en los cruzamientos no tienen suficiente diferencia en el tamaño del genoma esta técnica no es útil para diferenciar los híbridos de sus parentales, lo que constituye una limitación para su uso (Rayburn *et al.*, 2005). Sin embargo, es una técnica rápida y fiable para la identificación de híbridos cuando el tamaño del genoma de las especies parentales es diferente (Ordoñez *et al.*, 2016; Amano *et al.*, 2007; Simonovick *et al.*, 2007). No siempre sucede que el contenido de ADN de los híbridos sea intermedio respecto al de los parentales, como ocurrió con HPC, Castillo (2012) investigando cruzamientos interespecíficos entre *Lotus corniculatus* y *Lotus uliginosus* encontró individuos con contenidos de ADN mayores al de los parentales que igual sirvió para confirmar el estatus híbrido. Amano *et al.* (2007) determinaron híbridos interespecíficos e intergenéricos en las especies ornamentales *Gloriosa* spp., *Lottonia modesta* y *Sandersonia aurantica*, utilizando citometría de flujo y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o amplificación aleatoria de ADN polimórfico). Cuando *Sandersonia aurantiaca* fue usada como parental, algunos híbridos intergenéricos, exhibieron valores mayores o menores que el valor promedio del contenido de ADN.

Con respecto a la viabilidad de los granos de polen en HPC, el porcentaje de granos de polen viables permite confirmar su naturaleza híbrida como se ha reportado tanto

en cruzamientos intergenéricos como interespecíficos (Kravchik *et al.*, 2019; Queiroz *et al.*, 2018). Moyle y Graham (2005) al estudiar la base genética de la incompatibilidad de híbridos entre *Lycopersicon esculentum* y *L. hirsutum* encontraron reducción importante en la fertilidad del polen de las plantas híbridas en comparación con la de los progenitores. Híbridos interespecíficos de *Solanum melongena* con otras especies silvestres mostraron baja viabilidad, tal es el caso de híbridos con *S. tomentosum*, donde el porcentaje de granos de polen viables es de 5,5 % valor similar al obtenido en HPC (Kouassi *et al.*, 2016).

En muchos casos, la esterilidad en los híbridos se debe a los diferentes números de cromosomas mostrados por los padres que conducen a la generación de gametos desequilibrados en los híbridos (Gómez Martínez & Reyes Valdés, 2016). Además, el comportamiento cromosómico meiótico puede afectar la viabilidad del polen. Si la meiosis es irregular y los pares de cromosomas se segregan de manera anormal, se puede esperar esterilidad de polen (Fuchs *et al.*, 2011). Li *et al.* (2017) demostraron la asociación entre la viabilidad del polen y la constitución cromosómica del híbrido intergenérico en cruzamientos entre *Brassica oleracea* y *Sinapis alba* donde casi todas las plantas F1 eran altamente masculinas estériles.

Por otro lado, se realizaron estudios moleculares en el híbrido HPC debido a que la caracterización e identificación genética del germoplasma, mediante marcadores moleculares, constituyen un área de aplicación de creciente importancia dentro de la producción vegetal, considerándose relevante el conocimiento de la variabilidad de la flora nativa con potencial ornamental que puede llegar a competir dentro del mercado florícola, tanto nacional como internacional. En este sentido, los marcadores moleculares son herramientas claves tanto para la clasificación del germoplasma como para su aplicación en programas de mejoramiento y selección asistida por marcadores (Morales & Chiluisa-Utreras, 2022).

Como en la mayoría de las especies de interés ornamental, aún no está disponible el genoma completo para *Calibrachoa* y *Petunia*, por lo que es importante la búsqueda de nuevas estrategias para su desarrollo (Pérez de la Torre, 2011). Dentro de las distintas tecnologías que existen para el desarrollo de marcadores moleculares, sin el conocimiento de la secuencia de ADN, se encuentran los ISSR

(Inter Simple Sequence Repeat – microsatélites anclados) que pueden proveer gran número de marcadores con baja inversión y son sensibles a bajos niveles de variación genética (Wang *et al.*, 2009).

Según González *et al.* (2005) y Pérez de la Torre *et al.* (2010), el nivel de polimorfismo detectado por los ISSR depende de la especie vegetal a ser analizada y del tipo de secuencia repetitiva incorporada al iniciador utilizado para generar los productos de amplificación. En este trabajo se utilizaron los mismos iniciadores que los descritos por Escandón *et al.* (2007 b) y también utilizados por Pérez de la Torre (2011), en los cuales se lograron identificar molecularmente nuevas variedades de *Nierembergia lineariaefolia* y distintos individuos de *Calibrachoa*, respectivamente. En *Nierembergia* se realizó el análisis de 6 variedades de *N. lineariaefolia* mediante AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ISSR, logrando obtener resultados similares por ambas técnicas, demostrando que la sensibilidad de 13 iniciadores ISSR era comparable a la de seis combinaciones de enzima/iniciador de AFLP, sumado a la baja laboriosidad de la técnica y el bajo costo de los ISSRs (Pérez de la Torre, 2011). En los marcadores ISSR las bandas son leídas como marcadores dominantes y si el individuo parental muestreado fuera heterocigota para cualquier iniciador utilizado, mostraría bandas en las amplificaciones, mientras que la ausencia de bandas podría deberse a distintas circunstancias como pasar a ser homocigota recesivo al formar el híbrido, a la no existencia de un sitio de unión completo al iniciador debido a una mutación, inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente y por lo tanto, sería posible identificar bandas en los parentales que no se encuentran en el híbrido (González & Aguirre, 2007). Esto podría explicar los resultados obtenidos al realizar los estudios moleculares con ISSR en el híbrido HPC, donde se observa en su mayoría la presencia de bandas del parental femenino en el híbrido HPC, mientras que las bandas del parental masculino se aprecian sólo en el iniciador 3'GA. Resultados similares fueron obtenidos por Bianco *et al.* (2011) al estudiar los híbridos obtenidos en *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. donde la ausencia de

bandas del parental femenino en los híbridos obtenidos podría deberse a la condición homocigota altamente recesiva de este parental.

Por otro lado, la razón de la ausencia de bandas entre los padres y la descendencia fue explicada por Smith *et al.* (1996) sobre la base de que los cromosomas se entrecruzan durante la meiosis y puede resultar una pérdida de sitios de hibridación y por lo tanto los marcadores están presentes en uno de los padres, pero no en la descendencia. Resultados similares fueron obtenidos por Lou *et al.* (2002), quienes estudiaron la herencia de marcadores en híbridos de *Vitis quinquangularis* Rehder y *V. vinífera* L. y por Abdel-Mawgood *et al.* (2006), quienes desarrollaron marcadores de ADN para la identificación de híbridos de *Zea mays* L.

En los cruzamientos intergenéricos realizados en este trabajo de tesis, se obtiene el híbrido (HPC) utilizado como planta puente entre las especies empleadas dentro de cada género. De manera similar en *Lycopersicon esculentum* Mill. al usar el híbrido F1 de *L. esculentum* x *L. chilense* Dunal como puente, *L. peruvianum* var. *humifusum* Mill. se hibridó con éxito con *L. esculentum* (Kalloo, 2012). De igual modo, la hibridación de la especie tetraploide *Solanum stoloniferum* Schltdl. & Bouché con las especies diploides *S. phureja* Juz. & Bukasov, *S. brevidens* Phil. y *S. chacoense* Bitter, las cuales fueron utilizadas como plantas puente, permitieron incorporar variadas y valiosas resistencias para los cruzamientos posteriores con *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* L. o *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Juz. & Bukasov) Hawkes (Yermishin *et al.*, 2014; Estrada, 1990).

El cruzamiento de *P. inflata* x HPC y su recíproco fueron exitosos en la formación de frutos y obtención de plantas híbridas a partir de sus semillas. La combinación de HPC x *P. integrifolia* produjo semillas viables que desarrollaron plantas híbridas cuando HPC fue utilizado como parental femenino. El cruzamiento de *P. integrifolia* x HPC produjeron frutos y semillas, pero estas no germinaron, en este sentido, Vesperinas (1995) y Pignone & Gómez-Campo (2011) realizando cruzamientos entre *Eruca sativa* Mill. y *Eruca vesicaria* (L.) Cav. reportó la obtención de frutos y semillas aparentemente viables en ambos sentidos de cruzamiento, pero sólo se logró germinación en aquellas provenientes de los cruzamientos en que *E. sativa* fue utilizada como parental femenino.

Cruzamientos puentes entre HPC x *C. caesia*, *C. x hybrida* var. Kabloom yellow y var. Kabloom blue produjeron frutos y semillas que no germinaron. Este defecto en la germinación denota nuevamente la posible existencia de una barrera poscigótica que puede provenir de diversos orígenes como fallas en la impronta genómica o problemas en el desarrollo del endosperma (Köhler *et al.*, 2021; Ali, 2016; Wolff *et al.*, 2015). Por otro lado, cruzamientos entre todas las combinaciones de *Calibrachoa* con HPC como parental masculino no mostraron formación de frutos debido a la presencia de compatibilidad unilateral, aspecto similar al encontrado por Olschowski *et al.* (2012) en cruzamientos entre petunias y calibrachoas comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Mawgood, A.;** Ahmed, M.; Ali, B. (2006). Application of molecular markers for hybrids maize (*Zea mays* L.) identification. *Jornal of Food Agriculture and Environment*. 4:176–178.
- Afkhami-Sarvestani, R.;** Serek, M. and Winkelmann, T. (2012). Interspecific crosses within the *Streptocarpus* subgenus *Streptocarpella* and intergeneric crosses between *Streptocarpella* and *Saintpaulia ionantha* genotypes. *Scientia Horticulturae*. 148: 215 - 222.
- Alexander, M.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain technology*. 44(3): 117-122.
- Ali, M.** (2016). Endosperm-based postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* and *Capsella*. Plant Biology Master's program. <http://stud.epsilon.slu.se>
- Amano, J.;** Kuwayama, Y.; Mizuta, T.; Oomiya, T.; Nakamura N. and M. Nakano. (2007). Early Identification of Intra- and Intergeneric Hybrids among Colchicaceous Ornamentals, *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* and *Sandersonia auriantica* Hook. by Flow Cytometry and Amplified Polymorphic DNA. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*. 76(1):73-78.
- Ando, T.;** Ueda, Y. and Hashimoto, G. (1992). Historical survey and present status of systematics in the genus *Petunia* Jussieu (Solanaceae). *Technical Bulletin of Faculty of Horticulture (Chiba University)*. 45: 17-26.
- Ando, T.;** Kokubun, H.; Watanabe, H.; Tanaka, N.; Yukawa, T.; Hashimoto, G.; Marchesi, E.; Suárez, E. and Basualdo, L. (2005). Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* 96: 289-297.
- Atlagić, J.** (1996). Cytogenetic studies in hexaploid *Helianthus* species and their F1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annum*. *Plant breeding*. 115(4): 257-260.
- Berry, P.** y D'Arcy, W. (2018). Solanales. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/plant/Solanales>. Visitado 03/02/20.

- Bianco, C.;** Fernández, J.; Migliaro, D.; Crino, P. and Egea-Gilabert, C. (2011). Identification of F1 hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological analysis. *Molecular breeding*. 27(2), 157-170.
- Bonells. J.** (2019). Gardening in a changing climate. Royal Horticultural Society. <https://jardinessinfronteras.com/2019/10/04/la-jardineria-ante-el-cambio-climatico/>
- Buitendijk, J.;** Boon, E. and Ramanna, M. (1997). Nuclear ADN content in twenty species of *Alstroemeria* L. and some of their Hybrids. *Annals of Botany* .79: 343-353.
- Bugallo, V.** (2017). Aspectos reproductivos, citogenéticos y evolutivos aplicados al mejoramiento en el género *Passiflora* L. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales). Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6250_Bugallo. Visitado 06/05/20.
- Cara, N.;** Ferrer, M.; Masuelli, R.; Camadro, E. and Marfil, C. (2019). Epigenetic consequences of interploidal hybridisation in synthetic and natural interspecific potato hybrids. *New Phytologist*. 222: 1981- 1993.
- Cárdenas Contreras, Z.** (2009). Identificación de híbridos en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante el uso de marcadores COSII. Tesis presentada para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad Javeriana. 101 pp.
- Chu, Y.;** Pan, J.; Wu, A.; Cai, R. and H. Chen. (2014). Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*. *Scientia Horticulturae* 165:398-403.
- Castillo, A.** (2012). Generación de híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y evaluación de la respuesta a déficit hídrico. Tesis de Doctorado en el Área de Ciencias Biológicas. Facultad de Agronomía. Universidad de la República de Uruguay.
- Cid-Contreras, R.;** Mascorro-Gallardo, J. and Valadez-Moctezuma, E. (2019). Genotyping and molecular analysis of transgenic sequences in chrysanthemum (*Chrysanthemum X morifolium* Ramat). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 19(3): 285-290.

- Cremona, G.;** Iovene, M.; Festa, G. Conicella, C. and Parisi, M. (2018). Production of embryo rescued hybrids between the landrace “Friariello” (*Capsicum annuum* var. *annuum*) and *C. baccatum* var. *pendulum*: phenotypic and cytological characterization. *Euphytica* 214, 129.
- Cuervo, P.** (2006). Avances en el rescate de embriones en palma de aceite: una herramienta eficiente en material genético de difícil germinación. *Cenipalma*. N°139.
- Datta, S.** (2019). Floriculture work at CSIR-National Research Institute, Lucknow. *Science and Culture* 85:265-274.
- De Souza, E.;** Souza, F.; Rossi, M.; Pereira de Carvalho Costa, M. and Pinheiro Martinelli, A. (2017). Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. *Scientia Horticulturae*. *Scientia Horticulturae*. 223: 53-61.
- De Nettancourt D.** (2005). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Berlin: Springer.
- Dinu, I.;** Hayes, R.; Kynast, R.; Phillips, R. and Thill, C. (2005). Novel interseries hybrids in *Solanum*, section *Petota*. *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 403–415.
- Di Rienzo, J. A.;** Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C. 2008. InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Dolezel, J.;** Lucretti, S. and Schubert, I. (1994). Plant Chromosome Analysis and Sorting by flow cytometry. *Critical Review in Plant Sciences*. 13(3): 275-309.
- Escandón, A.;** Pérez de la Torre, M.; Acevedo, A.; Marcucci-Poltri, S. and Miyajima, I. (2005b). Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. *Proceedings of Vth on New Flor. Crops*. ISHS. A.F.C. Tombolato y G.M. Dias-Tagliacozzo eds. *Acta Horticulturae* 683. pp. 121-127.
- Escandón, A.;** Zelener, N.; Pérez de la Torre, M. y Soto, S. (2007b). Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia*, a native Argentinean ornamental plant. *Journal of Applied Genetics*. 48(2): 115-123.
- Escandón, A.;** Marinangelli, P. y Pérez de la Torre, M. (2010). Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein,

E. Hopp y L. Mroginski. Eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA. Parte V: Ejemplos de aplicaciones de la biotecnología vegetal. Capítulo 4. pp.: 421-433.

Estrada, N. (1990). Híbridos triploides derivados de *Solanum stolonifenun* y su valor en el mejoramiento de la papa. Revista Latinoamericana de la Papa. 3(1), 80-87.

Facciuto, G.; Bologna, P.; Bugallo, V.; y Rivera, M. (2019). Recursos genéticos ornamentales nativos de Argentina: de la colecta a la producción. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. 5 (1): 13-17.

Fuchs, M.; De Sousa, I.; Sanmartin Gajardo, I. y Viccini, L. (2011) Número de cromosomas en las células meióticas y la viabilidad del polen de *Vanhouttea hilariana* Chautems, *Vanhouttea brueggeri* Chautems y un híbrido interespecífico (Gesneriaceae). Servicio de Publicaciones, Universidad de Murcia. Anales de Biología 33:35-40.

Gamón Guillamón, A. (2020). Estudio de la descendencia del cruce entre *Centaurea aspera* (2x) y *C. gentilii* (4x). Nuevo híbrido *Hort ex. Centaurea x* (3x) (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Gómez Martínez, M. y Reyes Valdés, M. (2016). Irregularidades meióticas en híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* L. x *Tithonia rotundifolia* (Mill.) SF Blake. Revista Fitotecnia Mexicana 39(2):117-121.

González, A. and Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSRs). In: Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (Comp.), Ecología molecular, 567-571.

González, A.; Wong, A.; Delgado-Salinas, A.; Papa, R. and Gepts, P. (2005). Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean. Crop Science. 45: 606–615.

Greppi, J.; Hagiwara, J. y Stehmann, J. (2013). Novedades en *Calibrachoa* (solanaceae) y notas taxonómicas sobre el género para la Argentina. Darwiniana, nueva serie. 1(1): 173-187.

Greppi, J. (2014). Nuevos cultivares ornamentales del INTA comercializados en Argentina y en el mundo. Revista Viveros: septiembre 2015.

Greppi, J. (2019). Descubren una especie de *Petunia* inédita en el país. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

<https://www.argentina.gob.ar/noticias/descubren-una-especie-de-petunia-inedita-en-el-pais>. Visitado 06/02/2020.

Griesbach, R. (2006). *Petunia*. In Neil O. Anderson (ed.) Flower breeding and genetic. Pp. 301-336. University of Minnesota, Minnesota, U.S.A.

Haene, E. (2018). Los jardines con plantas nativas aportan biodiversidad urbana. Estudio de caso en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Perspectivas: Revista Científica de la Universidad de Belgrano. 1(1).

Hagiwara, J. (2016). Calibrachoa: una flor que conquista nuevos Jardines. INTA informa. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=33352>. Visitado 06/02/2020.

Horn, V. (2002). Breedin methods and Breeding Research. In: Vainstein A ed Breeding for Ornamental Plant: Classical and Molecular Approach. 47- 83.

Hussain, S. and Williams, W. (1997). Development of a fertile genetic bridge between *Trifolium ambiguum* M. Bieb. and *T. repens* L. Theoretical and Applied Genetics. 95(4): 678-690.

Jackson, R. (1988). A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). American journal of botany. 75(5): 609-614.

Jansky, S. and Hamernik, A. (2009). The introgression of 2× 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. Genetic Resources and Crop Evolution. 56(8): 1107.

Johnston, J.; Bennett, M.; Rayburn, L.; Galbraith, D. and Price, H. (1999). Reference standars for determination of DNA content of plant nuclei. American Journal of Botany. 86 (5): 609-613.

Kalloo, G. (ed.). (2012). Genetic improvement of tomato. Springer Science & Business Media. Berlin/Heidelberg, Germany.

Kanaya, T. (2016). Tendencias en el mercado mundial. Rev. Economía & Viveros. http://www.economiayviveros.com.ar/junio2016/actualidad_floricola_4.html. Visitado 31/03/20.

Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a ADN-specific fluorescent probe. Biotechnic & Histochemistry. 70(5): 220-232.

Kaur, D. and Singhal, V. (2019). Meiotic abnormalities affect genetic constitution and pollen viability in dicots from Indian cold deserts. BMC plant biology. 19(1): 10.

- Khrustaleva, L.** and KIK, C. (2000). Introgression of *Allium fistulosum* into *A. cepa* mediated by *A. roylei*. Theoretical and Applied Genetics. 100:17-26.
- Kiani, G.** and Katalani, C. (2018). Divergence in hybrid rice parental lines detected by RAPD and ISSR markers. Acta agriculturae Slovenica.111(2):369-376.
- Köhler, C.,** Dziasek, K. and Del Toro-De León, G. (2021). Postzygotic reproductive isolation established in the endosperm: mechanisms, drivers and relevance. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376(1826).
- Kouassi, B.,** Prohens, J.; Gramazio, P.; Kouassi, A.; Vilanova, S.; Galán-Ávila, A.; and Plazas, M. (2016). Development of backcross generations and new interspecific hybrid combinations for introgression breeding in eggplant (*Solanum melongena*). Scientia Horticulturae, 213: 199-207.
- Kravchik, M.,** Stav, R.; Belausov, E. and Arazi, T. (2019). Functional characterization of microRNA171 family in tomato. Plants. 8(1):10.
- Kulcheski, F.,** Muschner, R.; Lorenz-Lemke, A.; Stehmann, J.; Boniato, S.; Salzano, F. and Freitas, L. (2006). Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). Genetica 126: 3-14
- Kumar, M.,** Chaudhary, V.; Sirohi, U.; Singh, M.; Malik, S. and Naresh, R. (2018). Biochemical and molecular markers for characterization of *chrysanthemum* germplasm: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 7(5): 2641-2652.
- Li, J.,** Zhang, C.; Guan, C.; Luo, I.; Ren, L.; Wei, W.; Lu, g. and Fanf, X. (2017) Analysis of intergeneric sexual hybridization between transgenic *Brassica oleracea* and *Sinapis alba* . Euphytica 213:271.
- Lou S.,** He, P.; Zheng, X.; and Zhou, P. (2002) Inheritance of RAP markers in an interspecific F1 hybrid of grape between *Vitis quinquangularis* and *V. vinifera*. Scientia Horticulturae. 93:19–28.
- Loureiro, J.** y Santos, C. (2004). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Boletim de Biotecnologia. 77:18-29.
- Lush, W.,** Spurck, T.; and Joosten, R. (2000). Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceae plant. Annals of Botany. 85 (A):39-47.
- Manzini, G.,** Barcellona, M.; Avitabile, M. and Quadrifoglio, F. (1983). Interaction of

diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research*. 11(24): 8861–8876.

Messmer, M.; Wilbois, P.; Baier, C.; Schäfer, F.; Arncken, C.; Drexler, D.; *et al.* (2015). Técnicas de mejora vegetal. Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Valencia, España.

Milicia, V. (2012). Estudios de las relaciones de compatibilidad intergenéricas precigóticas, entre los géneros *Calibrachoa* y *Nierembergia*. Tesis presentada para optar al título de posgrado de Magister en Floricultura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. 152 pp.

Milicia, V.; Coviella, A.; Soto, M. y Chiesa, A. (2016). Mejoramiento de plantas nativas sudamericanas: altas temperaturas como herramienta para superar barreras precigóticas en el complejo *Calibrachoa-Nierembergia*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 32(2):85-93.

Moyle, L.; Graham, E. (2005) Genetics of hybrid incompatibility between *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Genetics*. 169 (1): 355-373.

Morales, J.; y Chiluisa-Utreras, V. (2022). Mejoramiento biotecnológico de plantas y modificación genética. Editorial Grupo Compás.

Olschowski, S.; Meyer, L.; Mußmann, V. and Serek, M. (2012). Investigation of crossing barriers between *Calibrachoa* and *Petunia* species. In *II All Africa Horticulture Congress 1007* (pp. 765-769).

Onamu, R.; Legaria, J.; Rodríguez, J.; Sahagùn, J. and Pèrez, J. (2016). Molecular characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 15(22): 1015-1025.

Ordoñez, B.; Orrillo, M. y Bonierbale, M. (2016). Manual biología reproductiva y citológica de la papa. Lima (Peru). International Potato Center (CIP). ISBN 978-92-9060-477-8. 2 ed. 65 p.

Pérez de la Torre, M.; Acevedo, A.; Serpa, J.; Miyajima, I. y Escandón, A. (2003). Puesta a punto de la técnica de microsatélites anclados para la caracterización de individuos selectos de Jacarandá. En: *Floricultura en la Argentina. Investigación y Tecnología de producción*. Mascarini, L. Vilella, F. y Wright, E, eds. pp: 3-12.

Pérez de la Torre, M. and Escandón, A. (2006). Construction of a molecular identification profile of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* by anchored microsatellites. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9.3

Pérez de la Torre, M.; Zirilli, P.; Ulrich, N.; Setten, L. y Escandón, A. (2010). Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav.(Plantaginaceae) utilizando marcadores ISSR. *Revista de la Facultad de Agronomía. La Plata*. 109(1): 23-30.

Perez De La Torre, M. (2011). Análisis de la variabilidad genética mediante marcadores ISSR en *Calibrachoa* (Tesis de maestría, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires).

Pershina, L. and Trubacheeva, N. (2017). Interspecific incompatibility in the wide hybridization of plants and ways to overcome it. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 7: 358–368.

Pignone, D. and C. Gómez-Campo. (2011). *Eruca*. p. 149-160. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* Springer, Berlin, Germany.

Piosik, L.; Ruta-Piosik, M., Zenkteler, M. and zenkteler, E. (2019). Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica*. 215, 31.

Plazas, M.; Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P. y Prohens, J. (2014). Desarrollo y caracterización de híbridos y retrocruzamientos para la introgresión recíproca entre la berenjena común (*Solanum melongena*) y la berenjena escarlata (*S. aethiopicum*). *Actas de Horticultura nº 62. Comunicaciones Técnicas presentadas a XVIII Jornadas de Selección y Mejora de Plantas Hortícolas y VII Seminario de Mejora Genética Vegetal*.

Queiroz, T.; Silva, N. T.; Alves, S.; Nascimento, P. y Karsburg, I. (2018). Uso de diferentes corantes para a estimativa da viabilidade polínica e caracterização dos grãos de polens de sorgo granífero. *Agrarian Academy*. 5(09).

Rayburn, A.; McCloskey, R.; Tatum, T.; Bollero, G.; Jeschke, M. and Tranel, P. (2005). Genome Size Analysis of Weedy *Amaranthus* Species. *Crop Science*, 45:2557–2562.

Reis, C.; Sajo, M. and Stehmann, J. (2002). Leaf Structure and taxonomy of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology. 45: 59-66.

Rojas, J.; *et al.* (2019). Análisis de estudio la industria de las flores a nivel internacional. Curso de Profundización, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. Repositorio Institucional UNAD.

<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/26841>.

Saxena, A. and Rukam, T. (2020). Assessment of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) through ISSR marker. Research Journal of Biotechnology. 15 (3).

Salvi, L.; Pérez de la Torre, M.; Rodríguez, M. y Escandón, A. (2009). Ajuste de ISSRS para el análisis de la variabilidad genética en el género *Glandularia*. Posters. Sección 4: Omicas. Resúmenes. In Simposio Nacional de Biotecnología. 7 Congreso Internacional REDBIO Argentina. 20-24 de abril de 2009. Rosario, Santa Fe. Argentina. p 145.

Sharma, P.; Thakur, S. and Negi, R. (2019). Recent advances in breeding of tomato—a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 8(3):1275-1283.

Smith, T. (2002). Production guidelines for some new crops. University of Massachusetts. Extension, Amherst.

http://etd.fcla.edu/UF/UFE0007015/berghauer_e.pdf. Visitado 31/03/20.

Simonovik, B.; Ivančič A.; Jakše, J. and Bohanec, B. (2007). Production and genetic evaluation of interspecific hybrids within the genus *Sambucus*. Plant Breeding 122(6):628-633.

Smith, J.; Burke, C.; and Wagner, W. (1996). Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. Plant Systematics and Evolution. 200(1): 61-77

Soto, M. (2007). Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

- Soto, M.;** Facciuto, G.; Bullrich L.; Labarta, M. y Morisigue, D. 2022. Acceso y uso de los recursos fitogenéticos nativos de Argentina con fines ornamentales. INTA Ediciones. Buenos Aires. Argentina.
- Stelly, D.;** Kautz, K.; and Rooney, W. (1990). Pollen fertility of some simple and compound translocations of cotton. *Crop science*. 30(4): 952-955.
- Stehmann, J.;** Semir, J.; Dutilh, J. and Forni-Martins, E. (1996). Solanaceae. IOPB Chromosome Data. International Organization of Plant Biosystematics Newsletter. 26-27: 24.
- Stehmann, J.** and Semir, J. (1997). A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon*. 7: 417-419.
- Stehmann, J.** (1999). Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das 187 J. A. Greppi *et al.* Notas en *Calibrachoa* espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave and Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann and Semir. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Stehmann, J.** y Greppi, J. (2013). *Petunia*. En: Barboza, G.; Zuloaga, F.; Belgrano, M. y Anton, A. (eds). *Flora Argentina: Flora vascular de la República Argentina*. Dicotyledoneae, Solanaceae, Instituto de Botánica Darwinion, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, San Isidro, pp.127–134.
- Van Eijk, J.;** Van Raamsdonk, L.; Eikelboom, W. and Bino, R. (1991). Interspecific crosses between *Tulipa gesneriana* cultivars and wild *Tulipa* species: a survey. *Sexual Plant Reproduction*. 4:(1) 1-5.
- Van Tuyl, J.** and De Jeu, M. (2005). Methods for overcoming interspecific crossing Barriers. En: Shivana, k R Sawhney V K. Eds. *Pollen biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press. 273-292.
- Vesperinas, E.** (1995). Diferencias morfológicas e interfertilidad entre las especies arvenses *Eruca vesicaria* (L) Cav. y *E. sativa* Miller. In *Actas/Sociedad Española de Malherbología, Congreso 1995, Huesca 14, 15 y 16 de noviembre de 1995* (pp. 153-156). Instituto de Estudios Altoaragoneses.

- Wang, Y.;** Scarth, R. and Campbell, C. (2002). Interspecific hybridization between *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. and *F. esculentum* Moench. *Fagopyrum*. 19: 31-35.
- Wang, K.;** Kang, J.; Zhou, H.; Sun, Y.; Yang, Q.; Dong, J. and Meng, L. (2009) Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinensis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (19), pp. 4856-4863. ISSN 1684–5315.
- Watanabe, H.;** Ando, T.; Iida, S.; Susuki, A.; Buto, K.; Tsukamoto, T.; Hashimoto, G. and Marchesi, E. (1996). Cross Compatibility of *Petunia* Cultivars and *P. axillaris* with Native taxa of *Petunia* in Relation to their Chromosome number. *J. Japan, Soc. Hort. Sci.* 65: 625-634.
- Watanabe, H.;** Ando, T.; Nishino, E.; Kokobun, H.; Tsukamoto, T.; Hashimoto G. and Marchesi, E. (1999). Three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *American Journal of Botany* 86: 302-305
- Whelan, E.** 1982. Trisomic progeny from interspecific hybrids between *Helianthus maximiliani* and *H. annuus*. *Canadian Journal of genetics and cytology*. 24(4): 375-384.
- Wijsman, H.** and Jong, J. (1985). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization and Nomenclatural consequences in the *Petunia* group. *Acta Botanica Neerlandica*. 34:337-349
- Wijsman, H.** (1990). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Botanica Neerlandica*. 39: 101-102
- Wilkins, H.;** Anderson, N. (2006). Creation of New Floral Products. Annualization of perennials. Horticulture and commercial Significance. In: Anderson, N.O. ed Flower Breeding and Genetic. Issues, Challenges and Opportunities for the 21 st Century. Minnesota: Springer.
- Wolff, P.;** Jiang, H.; Wang, G.; Santos-Gonzalez, J. and Köhler, C. (2015). Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4: e10074.

- Yermishin, A.;** Polyukhovich, Y.; EVoronkova, E. and Savchuk, A. (2014). Production of hybrids between the 2EBN bridge species *Solanum verrucosum* and 1EBN diploid potato species. American Journal of Potato Research 91(6):610-617.
- Zhang, D.** and Sun, M. (2017). Determination of Interspecific Hybrids between *Hydrangea paniculata*, *H. macrophylla* and *H. serrata* using ISSR Markers. In 2017 ASHS Annual Conference. ASHS.
- Zuloaga, F.** y Morrone, O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Missouri: Missouri Botanical Garden press.

CAPÍTULO II



CAPITULO II

Embriogénesis y endospermogénesis en la hibridación intergenérica entre Calibrachoa y Petunia

INTRODUCCIÓN

Si bien la hibridación se presenta como una técnica de gran aplicación, la obtención de híbridos interespecíficos, y en mayor medida intergenéricos, está muchas veces limitada por diferentes barreras de incompatibilidad (De Souza *et al.*, 2017), las cuales han sido identificadas primero y sorteadas después produciendo variaciones genéticas y eventualmente germoplasma mejorado (Yermishin *et al.*, 2014). Las barreras de incompatibilidad se establecen antes o después de la fecundación. En cuanto a las barreras de prefecundación o precigóticas, Shivanna (2005) las clasifica considerando el lugar del gineceo en donde se manifiesta la incompatibilidad: en la superficie del estigma, en el estilo y en el ovario/óvulo. El conocimiento previo de la naturaleza de las barreras de incompatibilidad es lo que permite seleccionar o desarrollar diferentes métodos para superarlas. Entre los métodos precigóticos utilizados pueden mencionarse, como ejemplos, la polinización en estado temprano de pimpollo, exposición a altas temperaturas, el corte de estilo, el uso de diferentes formas de polinización y el injerto de estilo (Milicia *et al.*, 2016; Van Tuyl & Jeu, 2005).

A su vez, entre las barreras posfecundación o poscigóticas la más común es el aborto del embrión híbrido en diferentes estados de desarrollo (Shivanna, 2005). Entre las técnicas para intentar superar las barreras poscigóticas, el rescate embrionario es una de las más utilizadas, donde la identificación de los factores involucrados también resulta de suma importancia, siendo identificados, entre ellos, la presencia de genes letales, desarmonía genética en el embrión o fracaso del desarrollo del endosperma en etapas tempranas (Shivanna, 2005).

En Solanaceae, se han identificado barreras que incluyen esterilidad masculina núcleo-citoplasmática (Pino Pérez, 2012), poliploidía (Thompson & Lumaret, 1992), interacción estilo-tubo polínico (Kuligowska *et al.*, 2015) e interrupción del desarrollo del endosperma (Birchler, 2014).

Con respecto al endosperma, existen estudios que demuestran su rol esencial en el desarrollo de la semilla, tanto en la nutrición del embrión como fuente de señales requeridas en la embriogénesis (Köhler *et al.*, 2021; Ali, 2016; Wolff *et al.*, 2015). La interrupción del desarrollo del endosperma ha sido señalada en el género *Solanum* de la sección *Petota*, como mecanismo preventivo en la

hibridación entre especies, las cuales están aisladas desde el punto de vista reproductivo (Johnston & Hanneman, 1982).

Teniendo en cuenta los cruzamientos entre plantas con diferentes niveles de ploidía, como es el caso de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*, varias hipótesis han sido propuestas para explicar la interrupción en el desarrollo del endosperma que se produce cuando los cruzamientos resultan incompatibles. La relación genómica materna:paterna 2:1 en el endosperma, ha sido considerada una condición necesaria para el éxito en el desarrollo del endosperma tanto en cruzamientos intraespecíficos como interespecíficos e intergenéricos (Depetris, 2018). Sin embargo, aunque todos los casos de cruzamientos intraespecíficos con diferentes niveles de ploidía se ajustan a esta propuesta, parece no suceder igual con todos los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos. Una causa aparente es la intervención de genes específicos en el desarrollo del endosperma de los híbridos, los que pueden tener diferentes valores o “fuerzas” según las especies, sin tener en cuenta el nivel de ploidía (Masuelli y Camadro, 1997). De acuerdo con Köhler *et al.* (2021), para cada especie existe un número efectivo, esto es; el Balance del Número Endospermico (BNE), el cual no debe tener necesariamente una relación directa con el nivel de ploidía.

Es importante destacar que los estudios de embriogénesis y/o endospermogénesis en cruzamientos intergenéricos, puede ayudar a explicar el papel que juega dentro de las barreras de incompatibilidad, el complejo sistema del BNE en niveles precigóticos y poscigóticos (Masuelli & Camadro, 1997). Estos estudios también proporcionan información valiosa para la aplicación precisa de técnicas de rescate embrionario, las cuales posibilitan el aislamiento de embriones o la transferencia de los mismos a un medio nutritivo específico para su crecimiento y diferenciación *in vitro* antes que la semilla colapse (Raghavan, 2003). Las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas al mejoramiento son utilizadas para sortear barreras posfecundación causadas por la interrupción en el desarrollo del endosperma o el aborto del embrión (Van Tuyl & Jeu, 1997).

El rescate embrionario, como metodología para la obtención de híbridos, ha sido utilizado exitosamente en muchos cultivos ornamentales, siendo *Lilium* el género modelo en las técnicas de manipulación del estilo y de cultivo *in vitro* (Van Tuyl & Jeu, 2005).

Otros ejemplos en los cuales se haya empleado el rescate embrionario para la obtención de híbridos interespecíficos con fines ornamentales, se encuentran en los géneros *Begonia* L. (Chen, 2012), *Dendranthema* (DC.) Des Moul. (Xi Cheng, 2010), *Alstroemeria* (Van Tuyl y De Jeu, 2005). Dentro de la familia Solanaceae estas técnicas han sido utilizadas con éxito en géneros como *Capsicum* (Debbarama, 2013), *Nicotiana* (Liao, 2017), *Solanum* (Gaiero, 2017).

También su utilización se extiende a híbridos intergenéricos, como los obtenidos entre los géneros *Sinapis* L. y *Brassica* L. (Li *et al.*, 2017). El rescate embrionario presenta dos puntos a tener en cuenta, el primero es el aislamiento del embrión, y aquí se debe considerar el estado del mismo y la metodología utilizada. El segundo punto es el medio óptimo en el cual debe desarrollarse el embrión para asegurar el crecimiento y la diferenciación (Van Tuyl & Jeu, 2005).

Embriología de la familia Solanaceae.

De acuerdo con Johri *et al.* (1992) los géneros estudiados hasta el momento en la familia Solanaceae presentan en común las siguientes características embriológicas: el óvulo es hemianátropo, anátropo o campilótropo, unitegumentado y tenuinucelar. El endotelio generalmente se diferencia en el estado 2-nuclear del saco embrionario, encontrando variaciones como: ausencia de este tejido en *Nicotiana tabacum* L. y presencia prominente en *Capsicum* (Johri *et al.*, 1992). En la nucela se diferencia una única arquéspora o varias. Una única célula funciona como célula madre de las megásporas, la cual por meiosis produce una tétrada lineal o en forma de "T". La megáspora calazal genera un gametofito de tipo *Polygonum*, es decir monospórico, 7-célular, 8-nucleado en la mayoría de los casos, pero en *Capsicum frutescens* L., *C. nigrum* Willd. y *C. pendulum* Willd. el saco embrionario es de tipo *Allium*, es decir bispórico 7-célular, 8-nucleado. Las sinérgidas alargadas y las antípodas son efímeras (Johri *et al.*, 1992).

En el género *Solanum* la fecundación ocurre entre 24 y 48 h posteriores a la polinización. La primera división del núcleo endospermogénico se produce 48 h posteriores a la polinización y la división del cigoto ocurre aproximadamente, con el endosperma de 40 células (Johri *et al.*, 1992).

Los tres tipos de desarrollo de endosperma reportados en Solanaceae por Johri *et al.* (1992) son: el tipo Celular, el cual se presenta como el más común, el tipo

Nuclear que ocurre en *Salpiglossis picta* Sweet, *Scopolia atropoides* Schult. y *Schizanthus pinnatus* Ruiz y Pav. y el tipo Intermedio que se reporta en *Hyoscyamus orientalis* M.Bieb.

El desarrollo del embrión corresponde al tipo *Solanaceae* en *Sclerophylax caducifructus* Di Fulvio y de tipo *Onagraceae* en *Capsicum annuum* L. (Johri et al., 1992).

Son escasos los trabajos sobre el desarrollo embrionario y del endosperma en el género *Petunia*, según Ferguson (1927) y Cooper (1946) la fecundación ocurre entre las 24 y 32 h luego de la polinización. La estructura del saco embrionario maduro se ajusta muy estrechamente al tipo comúnmente descrito para las Angiospermas. Después de la fertilización, el embrión presenta las siguientes etapas de desarrollo: globular, cordiforme, torpedo y embrión maduro. El endosperma es de tipo celular y persiste en el embrión maduro como tejido de almacenamiento de reservas (Rezanejad, 2008). Por otro lado, reportes sobre estudios de embriogénesis y endospermogénesis en el género *Calibrachoa* como en híbridos intergenéricos entre ambos géneros son limitados.

OBJETIVOS

- A partir de estudios durante el proceso de embriogénesis identificar el momento oportuno para realizar rescates de embriones en aquellos cruzamientos que dan origen a híbridos putativos.
- Hallar el estado de desarrollo del embrión y endosperma en el que se manifiesta la incompatibilidad poscigótica.
- Conocer a nivel histológico cómo se manifiesta la incompatibilidad en la combinación putativa de *Petunia inflata* x *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Observación de cortes histológicos y estudios de embriogénesis en semillas híbridas

Se realizaron cruzamientos dirigidos entre cuatro especies nativas correspondientes al género *Petunia*: *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell (Cod. IF: 20060920C), *P. inflata* R.E. Fr (Cod. IF: 20060920F), *P. interior* Ando & Hashim. (Cod. IF: 200320b2) y *P. axillaris* subsp. *axillaris* (Cod. IF: 20060919E) (Fig.1); cuatro especies nativas correspondientes al género *Calibrachoa*: *C. linoides* (Hook.) Wijsmann (Cod. IF: 20081102B), *C. ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir (Cod. IF: 20081131A), *C. thymifolia* (A. St.-Hill.) Stehmann & Semir (Cod. IF: 20181022b1) y *C. caesia* (Sendth.) Wijsmann (Cod. IF: 20081111F) y dos variedades comerciales correspondientes al género *Calibrachoa*, *C. x hybrida* var. Kabloom blue y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow como parentales para la obtención de híbridos puente, los mismos fueron efectuados en estado de pimpollo. La emasculación fue realizada previa a la polinización; los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras juntamente con la corola e inmediatamente fue depositado sobre el estigma polen fresco.

Para la observación a través de cortes histológicos en semillas en desarrollo se realizaron inclusiones en parafina de frutos cosechados desde los 3 a los 10 días posteriores a la polinización (DPP). Para la fijación los frutos fueron conservados en un fijador a base de formol 10 %, alcohol etílico 50 %, ácido acético 5 % y agua destilada 35% (FAA). Posteriormente, se sometieron a un proceso de deshidratación con una serie de soluciones ascendentes de alcohol etílico en agua desionizada (Tabla 1).

Tabla 1.: Proceso de deshidratación de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.

DESHIDRATACIÓN	50% FAA / 50% alcohol 50°	12 horas
	alcohol 50°	12 horas
	50% alcohol / 50% alcohol 60°	12 horas
	alcohol 60°	12 horas
	50% alcohol 60° / 50% alcohol 70°	12 horas
	alcohol 70°	12 horas
	50% alcohol 70° / 50% alcohol 80°	12 horas
	alcohol 80°	12 horas
	50% alcohol 80° / 50% alcohol 96°	12 horas
	alcohol 96°	12 horas
	50% alcohol 96° / 50% alcohol 100°	12 horas
	alcohol 100°	12 horas

Finalizada la deshidratación, se procedió al aclarado progresivo del material en xilol (Tabla 2).

Tabla 2.: Proceso de aclarado de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.

ACLARADO	50% alcohol 100° / 50% xilol	8 horas
	xilol puro	8 horas

Luego del proceso de aclarado, se inició la inclusión de los materiales en parafina pura en escamas (56-58 °C) “tipo Paraplast” (Tabla 3).

Tabla 3.: Proceso de inclusión en parafina de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.

INCLUSIÓN	50% xilol / 50% parafina	8 horas
	parafina pura I	8 horas
	parafina pura II	8 horas

Para la inclusión, se confeccionaron moldes formando pequeñas cajas de papel, donde fueron ubicados los frutos en forma longitudinal.

Una vez solidificados se montaron individualmente sobre tacos de madera, para su seccionamiento posterior.

Los cortes seriados histológicos se realizaron con micrótomos rotativos verticales tipo “Minot” a un espesor de 12-15 µm.

Las secciones fueron adheridas sobre portaobjetos de vidrio con albumina de Meyer, e inmediatamente se realizó el planchado de las cintas cortadas con una plancha calefactora a temperatura constante.

Luego de haberse secado las muestras a temperatura ambiente, durante diez días, se llevó a cabo el desparafinado de los cortes. Este proceso se realizó en cajas de Coplin, para luego iniciar la coloración combinada doble sucesiva de safranina-fast green. Concluida la coloración, se montaron los preparados permanentes con bálsamo sintético (Álwik).

Las secciones de frutos obtenidos fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico Binocular “Biotraza” NLCD-307B con cámara fotográfica integrada.

2. Corte manual de semillas maduras

Se realizaron cruzamientos dirigidos de la manera descrita anteriormente entre las especies indicadas inicialmente. A los 25 DPP se realizó la recolección de los frutos formados en estado de madurez previo a la antesis. Las cápsulas fueron colocadas en cajas de Petri y fueron rotuladas en función de cada cruzamiento realizado. Fueron tomadas muestras de semillas tanto de los cruzamientos intergenéricos como de los intraespecíficos utilizados como testigo, las cuales fueron hidratadas en agua durante 12 h, luego fueron realizados los cortes longitudinales bajo lupa (Lupa trinocular "Biotraza" XTD-317T) a mano alzada utilizando una hoja flexible de afeitar y agujas histológicas. Las fotografías fueron tomadas acoplando a la lupa una cámara USB marca "Arcano".

RESULTADOS

1. Observación de cortes histológicos y estudios de embriogénesis en semillas híbridas

El gineceo de *Petunia inflata* presenta numerosos óvulos o rudimentos seminales anátropos, crasinucelados y bitegumentados (Fig. 2.1 a y b). Al igual que en otras Solanáceas el saco embrionario es de tipo *Polygonum* y consta, por lo tanto, de 3 antípodas poco desarrolladas en la zona del extremo calazal, 2 núcleos polares en la región central, 2 sinérgidas y una ovocélula en el extremo micropilar.

La fecundación ocurre entre los 2 y 3 días posteriores a la polinización (DPP), el tubo polínico penetra en el óvulo por la micrópila y libera los núcleos gaméticos masculinos (Fig. 2.1 a). Uno de ellos se une a la ovocélula, dando lugar al cigoto diploide y el otro al núcleo polar secundario, originando el núcleo endospermogénico que es triploide.

Antes de que el cigoto comience a dividirse para formar el embrión, el núcleo endospermogénico ha sufrido varias divisiones sucesivas que conducirán a la formación del endosperma de tipo nuclear.

En los cruzamientos intergenéricos entre *P. inflata* x *C. x hybrida* Var. Kabloom yellow a partir de los 4 DPP, se observa la presencia de cigotos en división al igual que se observan en el cruzamiento interespecífico testigo entre genotipos distintos de *P. inflata*. Entre los 3 y 4 DPP también se diferencian las células del endotelio en ambos cruzamientos (Fig. 2.2).

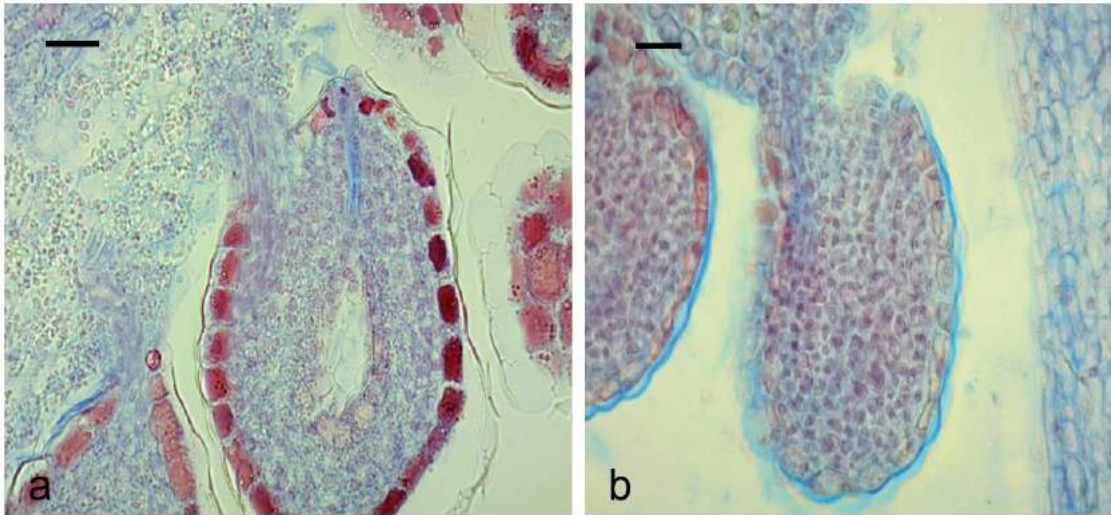


Figura 2.1. Óvulos de *P. inflata* utilizada en los cruzamientos intergenéricos.
a- Detalle del ingreso del tubo polínico de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.
b- Silueta del óvulo anátropo. Barras= 100 µm.

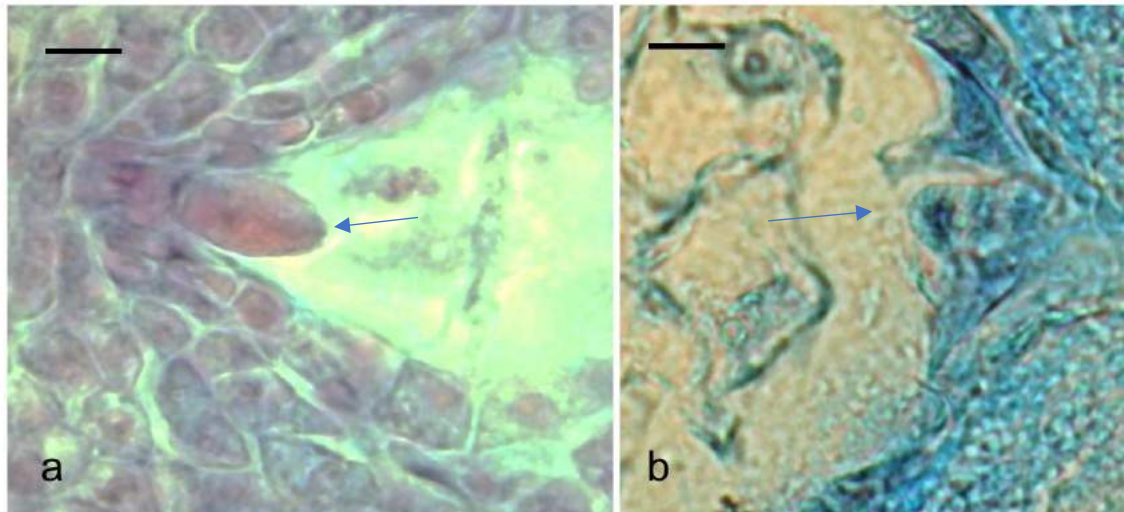


Figura 2.2. Cigotos de *Petunia* a 4 DPP. a- Cigoto formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. b- Cigoto formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *P. inflata*. Barras= 10 µm.

5 DPP puede observarse en el cruzamiento intergenérico como en el testigo el proembrión, originado por divisiones del cigoto y en el cual se encuentran diferenciadas las células que darán origen al suspensor (Fig. 2.3).

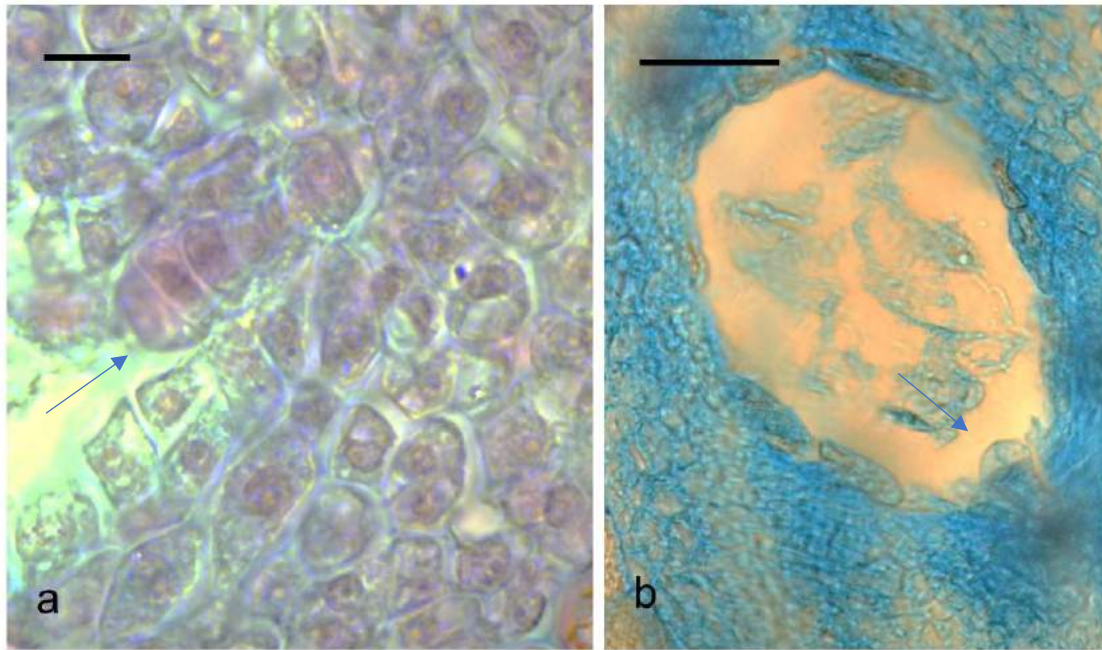


Figura 2.3. Proembriones de *Petunia* a 5 DPP. a- Proembrión formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. Barra= 10 µm.
b- Proembrión formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *P. inflata*. Barra= 50 µm.

Al mismo tiempo, el endosperma en estado nuclear del cruzamiento entre *P. inflata* x *C. x hybrida* Var. Kabloom yellow detiene la división de los núcleos y no continúa su desarrollo, mientras que en el cruzamiento testigo continúa la división nuclear (Fig.2.4).

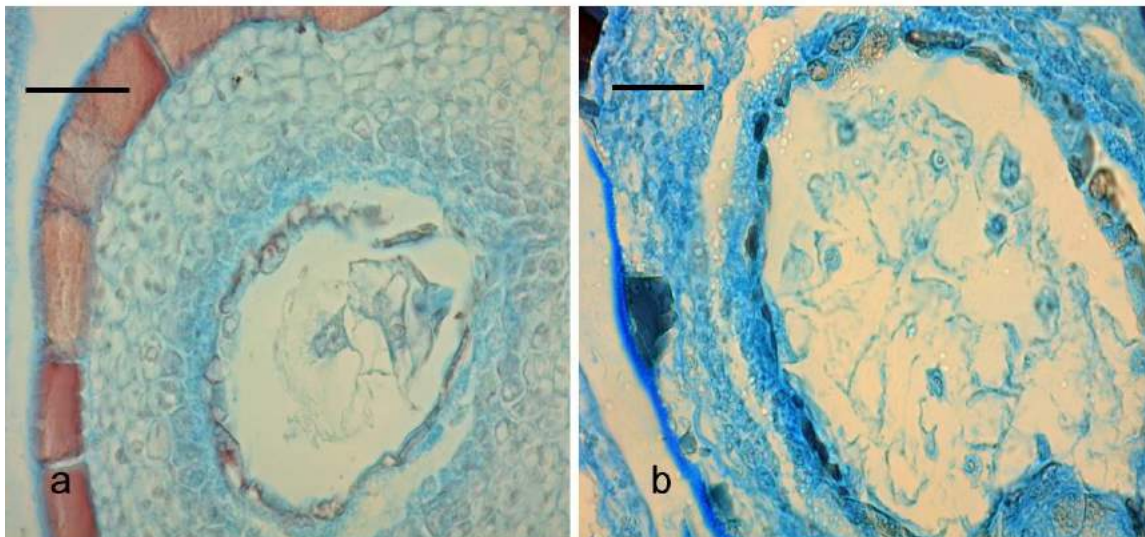


Figura 2.4. Endospermas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos a 5 DPP.
a- Endosperma formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.
b- Endosperma formado por el cruzamiento de *P. inflata* x *P. inflata*.
Barras = 50 µm.

6 DPP se observan embriones degenerados en algunos óvulos fecundados y proembriones en los primeros estadios de división en otros, mientras que en el cruzamiento testigo se observan embriones que continúan su crecimiento hacia el estado globular temprano (Fig.2.5).

A los 7 DPP se observa la desaparición de embriones en la zona micropilar de gran parte de los óvulos de los cruzamientos intergenéricos y la desorganización de las células que conforman el endotelio (Fig. 2.6). En los cruzamientos testigo continúa el crecimiento del embrión globular que presenta 80 μm de longitud incluyendo el suspensor, por 60 μm de diámetro en la zona globular. Se observa celularización de los núcleos del endosperma y acumulación de sustancias de reserva en las células que conforman el endosperma de tipo celular. El endotelio se mantiene conservado (Fig. 2.7).

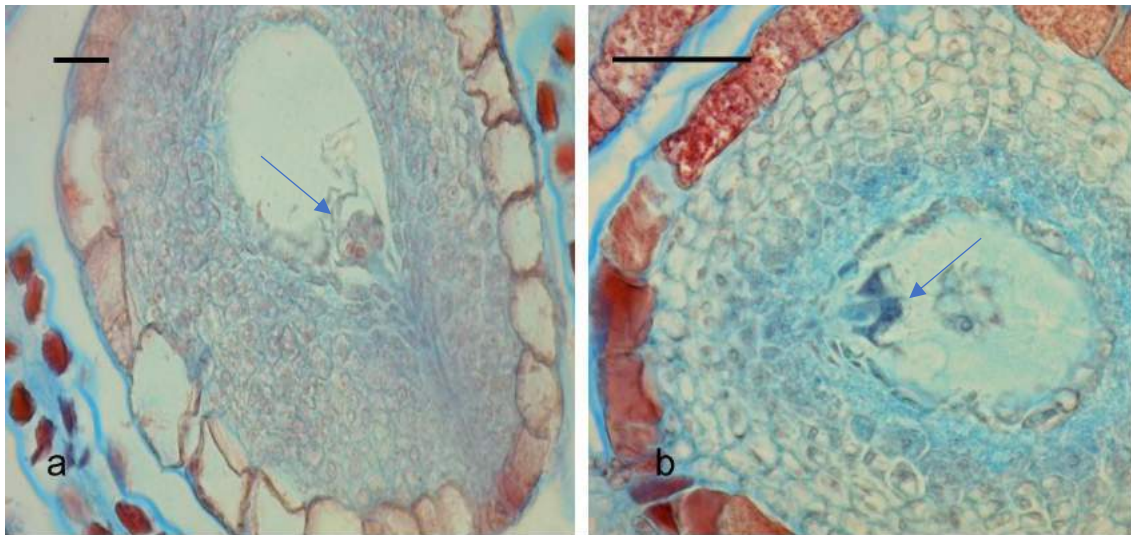


Figura 2.5. Embriones y proembriones de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 6 DPP. a- Embrión degenerado. Barra= 100 μm . b- Proembrión. Barra= 50 μm .

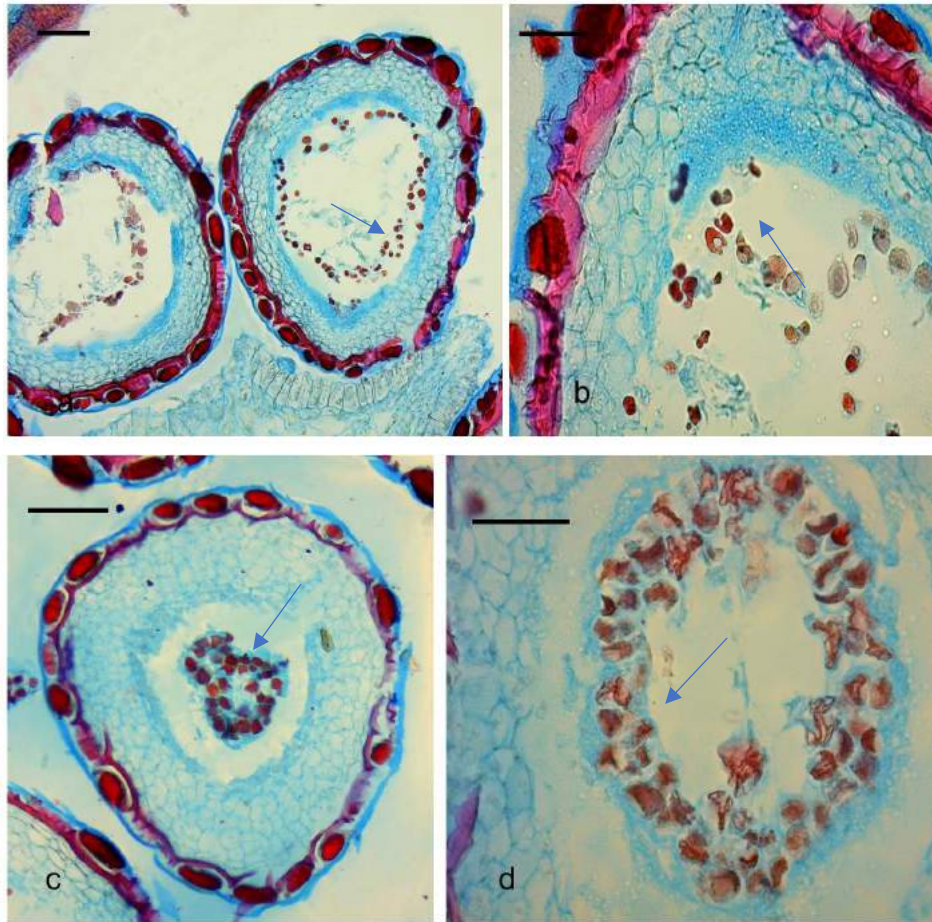


Figura 2.6. Óvulos fecundados de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 7 DPP. a- Endotelio desorganizado. Barra = 100 μ m. b- Ausencia de embriones en zona micropilar. Barra = 50 μ m. c y d- detalle de la vista superficial del endotelio desorganizado. c: Barra = 100 μ m. d: Barra = 50 μ m.

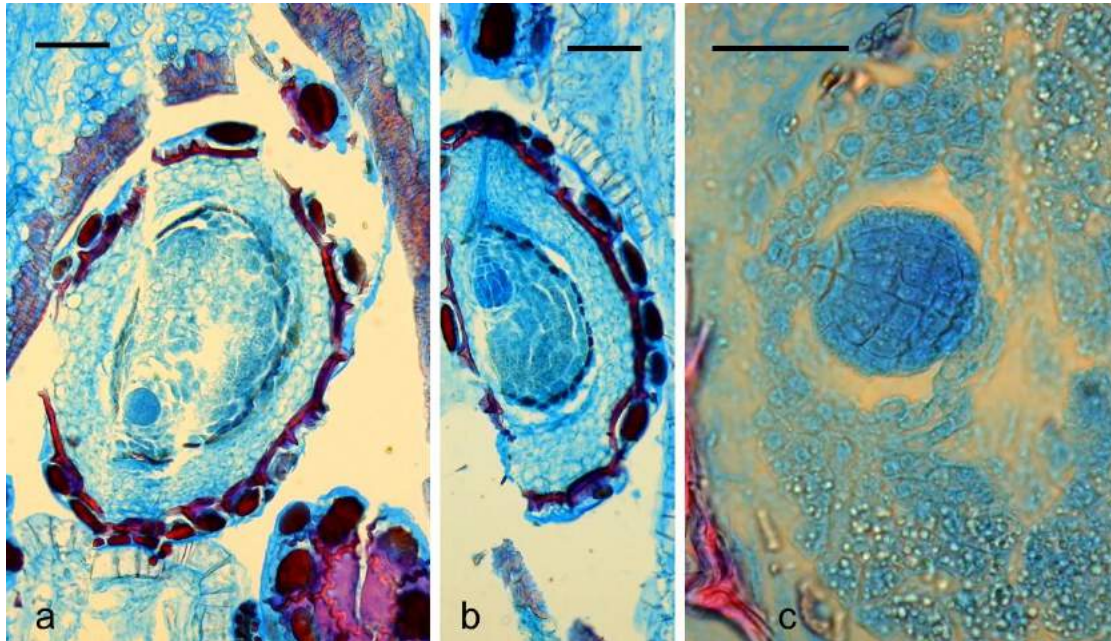


Figura 2.7. Desarrollo de embriones y endosperma en óvulos fecundados de *P. inflata* x *P. inflata* a 7 DPP. a- Embrión globular con endosperma en celularización. Barra= 100 µm. b- Detalle del embrión medido. Barra= 100 µm. c- Detalle de células del endosperma con acumulación de sustancias de reservas. Barra= 50 µm.

Entre los 8 y 10 DPP no se observan mayores cambios en la anatomía interna de la mayoría de los óvulos fecundados en los cruzamientos intergenéricos, pero se destaca el endurecimiento de los tegumentos. Excepcionalmente se observan algunos óvulos con embriones con forma asincrónica a los 10 DPP sin observarse presencia de endosperma celular (Fig. 2.8).

En los cruzamientos testigo se pueden apreciar embriones en estado globular transformándose a estado de corazón, entre los 8 y 9 DPP, y embriones en estado de torpedo a los 10 DPP. El endosperma se encuentra celularizado y el endotelio se desorganiza a los 10 DPP (Fig. 2.9).

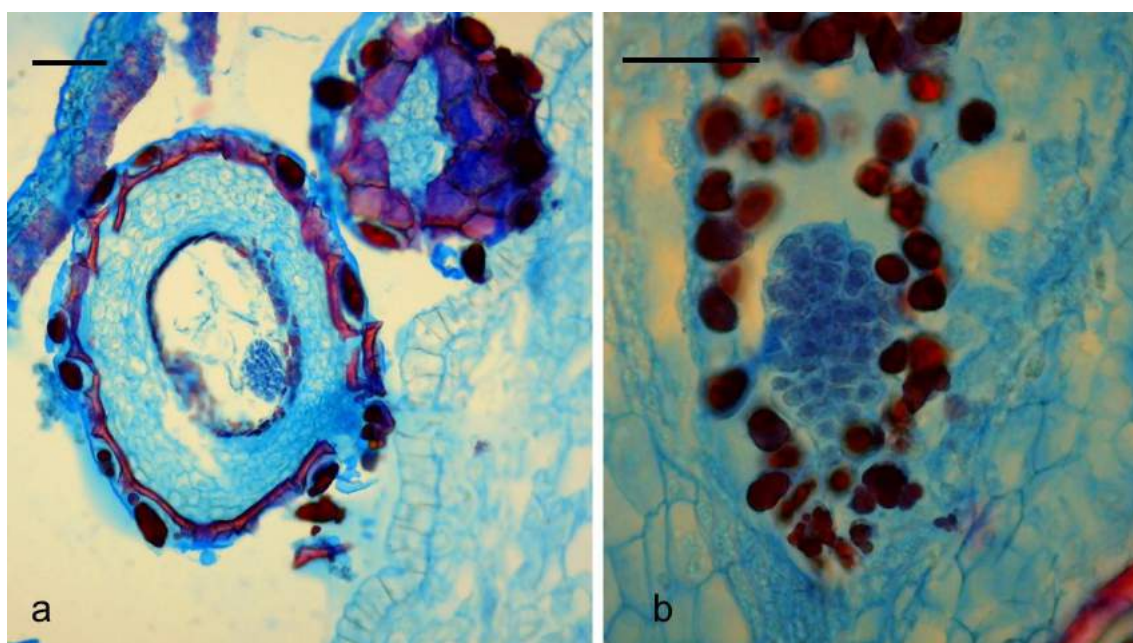


Figura 2.8. a-b: Embriones observados excepcionalmente en cruzamientos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 10 DPP. a- Barra= 100 μ m. b- Barra= 50 μ m.

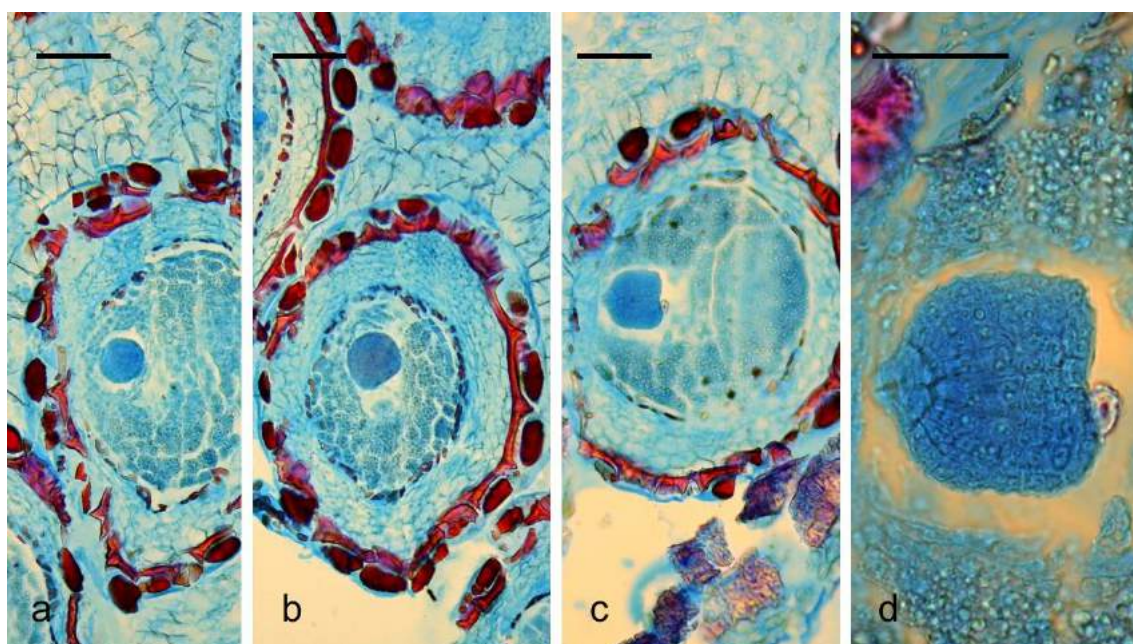


Figura 2.9. a-b-c-d: Embriones observados en cruzamientos de *P. inflata* x *P. inflata* entre los 8 y 9 DPP. a-b-c = Barra= 100 μ m. d- Barra= 50 μ m.

2. Cortes de semillas maduras

A los 25 DPP las semillas se encuentran maduras tanto en los cruzamientos intergenéricos como en los intraespecíficos utilizados como testigo. Ambas presentan aspecto externo similar, con forma esferoidal algo angulosa y el tegumento externo con presencia de células epidérmicas que forman un arreglo isomorfológico con hexágonos limitados por los relieves marginales de las células. Las semillas embebidas tienen un diámetro aproximado de 600 μm (Fig. 2.10).

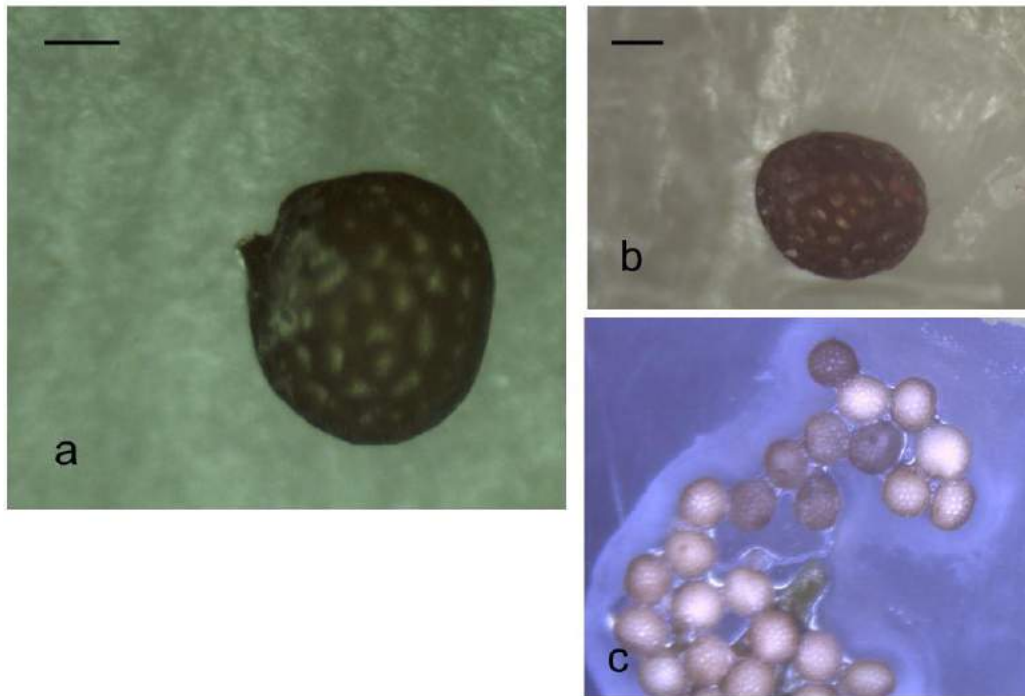


Figura 2.10. a- Semilla madura hidratada obtenida en el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a los 25 DPP. b-c: Semillas maduras hidratadas obtenidas en cruzamientos de *P. inflata* x *P. inflata* a los 25 DPP. Barras= 100 μm .

Los cortes longitudinales de las semillas formadas en todos los cruzamientos intergenéricos involucrados en este trabajo que presentaron tasa de fructificación mayor a cero mostraron gran número de semillas vanas, es decir, solamente con desarrollo del tegumento y ausencia de embrión y endosperma (Fig. 2.11).

En los cruzamientos testigo, además del tegumento, se observa la presencia del embrión de aproximadamente 500 μm de longitud y del endosperma desarrollado (Fig. 2.12).



Figura 2.11. Tegumento de semillas híbridas obtenidas en los cruzamientos intergenéricos entre las distintas especies de *Petunia* y *Calibrachoa* que formaron frutos en el presente trabajo a los 25 DPP. Barra= 100 μ m.



Figura 2.12. Corte longitudinal de semillas obtenidas en los cruzamientos intraespecíficos testigo entre las distintas especies de *Petunia* a los 25 DPP. Barra= 100 μ m.

DISCUSIÓN

En las observaciones realizadas en el presente estudio, las combinaciones incompatibles, presentaron anomalías en el desarrollo, tanto del embrión como del endosperma. El endosperma cuyo desarrollo hasta el 5 DPP es normal para cruzamientos compatibles e incompatibles, interrumpe su crecimiento en los cruzamientos intergenéricos y a esta interrupción le sucede el aborto del embrión. Un proceso similar es detectado en cruzamientos interespecíficos entre diferentes especies del género *Fagopyrum* Mill. donde se encontraron varias anomalías en embriones híbridos abortados, como embriones de forma irregular, suspensor aislado, células oscurecidas y/o vacuoladas sin núcleos y endospermas y núcleos varados (Woo *et al.*, 2008). Dentro de la familia Solanáceas, híbridos interespecíficos entre *Solanum incanum* L. y *Solanum pinnatisectum* L. presentaron el saco embrionario gravemente distorsionado e irregular, y no se observó evidencia de ningún embrión a los 6 DPP a pesar de búsquedas diligentes de secciones seriadas de numerosos óvulos (Lester & Kang, 1998). Resultados similares a los encontrados en los cortes histológicos de los cruzamientos entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow, donde a partir de los 7 DPP no se observan embriones en desarrollo normal o anormal. En este sentido, aunque es bien conocida la importancia del endosperma como reserva de nutrientes en muchas semillas de Angiospermas, su significado durante la embriogénesis no debe ser descuidado (Doll & Ingram, 2022). En muchos híbridos interespecíficos e intergenéricos los embriones no se desarrollan completamente y abortan, por ello, a menudo, se ha afirmado que esto se debe a que el endosperma no puede conducir suficientes nutrientes para el embrión, pero otras interacciones menos conocidas han sugerido que el endosperma controla activamente la mayoría de las primeras etapas de la morfogénesis del embrión (Doll & Ingram, 2022). El endosperma juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de un medio adecuado para el crecimiento de los jóvenes embriones, proporcionando alimento y otras condiciones esenciales para el crecimiento y diferenciación del cigoto (An *et al.*, 2020). En las semillas exalbuminadas el endosperma a menudo se degenera a medida que las semillas maduran, y se acumulan reservas en los cotiledones. El

proceso de doble fecundación de las Angiospermas posiblemente dota al endosperma de vigor híbrido permitiéndole competir con éxito con el entorno de tejidos maternos para el suministro de alimentos para sí mismo y el embrión en crecimiento (An *et al.*, 2020). Un gameto masculino fertiliza al núcleo de la oosfera para formar el cigoto diploide que por divisiones mitóticas se convierte en el embrión. Sin embargo, antes de que esto suceda, el otro gameto fertiliza a la célula central y se une con los núcleos polares fusionados para formar el núcleo endospermogénico primario triploide que luego da lugar al endosperma, un tejido constituido con dos genomas maternos idénticos y uno paterno (Sprunck, 2020). La interrupción del desarrollo del endosperma podría ser ocasionada por un desbalance en la relación genómica del mismo (Städler *et al.*, 2021; Dinu *et al.*, 2005) considerando al género *Petunia* ($2n=2x= 14$) y *Calibrachoa* ($2n=2x= 18$) (Chu *et al.*, 2014). Desbalances de este tipo son descritos por Masuelli y Camadro (1997; 1995) en cruzamientos interespecíficos de especies salvajes del género *Solanum*, donde el BNE juega un rol principal en la interrupción del desarrollo del endosperma. Durante mucho tiempo se ha reconocido que la producción exitosa de semillas de híbridos interespecíficos e intergenéricos depende no sólo de la compatibilidad de los dos genomas parentales combinados en el embrión híbrido, sino también de alguna manera de las interacciones entre estos genomas en el endosperma, entre el embrión y el endosperma, y posiblemente incluso con el tejido esporofítico en los óvulos (Städler *et al.*, 2021). Al respecto, la relación genómica materna:paterna (2:1) en el endosperma ha sido considerada una condición necesaria para el éxito del desarrollo del endosperma (Köhler *et al.*, 2021). La viabilidad de las semillas no siempre depende directamente del nivel de ploidía; de hecho, se ha postulado que son dos o tres genes los responsables del sistema BNE (Lafon-Placette *et al.*, 2018). Aún más, Masuelli & Camadro (2005) reportan que el desbalance endospermico está dado por “fuerzas” (o valores) características de cada especie, pudiendo estar relacionado con la carga alélica o el número de genes involucrados. Esta hipótesis del BNE ha resultado útil, tanto en complicadas hibridaciones interespecíficas que involucran varios niveles de ploidía, como también para postular la posible evolución de las papas silvestres en todo México y América del Sur (Hawkes & Jackson, 1992). Sin embargo, para algunos investigadores hay algunas inconsistencias en esta hipótesis debido a

que el criterio de éxito fue obtenido en pocas semillas normales y la histología del desarrollo del endosperma no fue considerada (Katsiotis *et al.*, 1995).

Por el contrario, la desintegración del endosperma y del embrión podría haberse debido a autólisis celular, considerando que en las primeras etapas de desarrollo puede haber crecimiento normal y semanas después de la polinización, en la fase embrionaria globular temprana el endosperma y luego el embrión se autodegradan (Daunay *et al.*, 2019). Esto podría explicarse considerando que el desarrollo normal del embrión puede ser controlado por el endosperma, donde se producirían diferentes reguladores de crecimiento u otras moléculas mensajeras, así como sustancias alimenticias. Las vías biosintéticas para producir estas moléculas dependen de enzimas diferentes producidas en distintas etapas. Asimismo, nuevas moléculas de ARN mensajero y proteínas son producidas y las antiguas se descomponen en procesos que involucran un control genético bioquímico para la producción y control de proteasas y nucleasas (Andrade Buono *et al.*, 2019). Sin embargo, en los híbridos interespecíficos e intergenéricos los diferentes mecanismos de control de ambos padres se mezclan dentro del mismo núcleo del endosperma y, si estos mecanismos son incompatibles, puede ser que se pierda el control adecuado de la producción y ubicación de nucleasas y proteasas y puede haber producción en exceso cuando el control de la biosíntesis no está adecuadamente coordinado por los núcleos híbridos que presentan desequilibrios genéticos (Valandro *et al.*, 2020; Briggs, 1996, 1995, 1993a, b) causando así la digestión no deseada de las células que componen el embrión, como se observa en este trabajo y o también en el endosperma como se citó para el género *Solanum*.

En este sentido, investigaciones más recientes alientan en concepto de muerte celular programada (MCP o PCD). La MCP es un proceso activado y accionado por la propia célula, organizado a nivel genético y bioquímico (Locato & De Cara, 2018). Esto implica que las células conservan los mecanismos moleculares requeridos para llevar a cabo su propia destrucción. Implica una intrincada red de vías de señalización que incluyen diferentes tipos de señales moleculares, como hormonas vegetales, calcio, nucleótidos cíclicos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) (Locato y De Cara, 2018). Al mismo tiempo, la actuación de la MCP conlleva la interrelación entre diferentes compartimentos subcelulares, como las mitocondrias, los cloroplastos, la vacuola, el retículo

endoplásmico y el núcleo, posiblemente involucrando señales anterógradas y retrógradas que aún no han sido completamente identificadas (Van Aken & Pogson, 2017; Ng *et al.*, 2014).

Algunos investigadores han sugerido el concepto de MCP autolítica, la cual ocurre por ruptura del tonoplasto lo que conduce a la eliminación del citoplasma debido a la liberación de nucleasas y proteasas, acidificación del citoplasma y degradación rápida de ácidos nucleicos y proteínas (Escamez & Tuominen, 2014). La eliminación selectiva de las células por MCP en la embriogénesis incompatible representa una estrategia para impedir la propagación de características genéticas negativas en la progenie (Locato y De Cara, 2018). Otros investigadores prefieren diferenciar los tipos de MCP desde un punto de vista funcional, es decir, MCP regulada por el desarrollo (dMCP) e inducida por el medio ambiente (eMCP). dMCP se activa por estímulos internos y es generalmente autolítica (Huysmans *et al.*, 2016). Se podría asumir que procesos semejantes pudieran regir la degradación de la mayoría de los embriones en los cruzamientos entre los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

En cuanto al endotelio, se denomina de esta manera a la única capa de células que envuelve al endosperma, excepto en el extremo chalazal. También es conocida como capa pigmento, tapete tegumentario, epidermis interna, endotecio, capa de tegumento interno y capa del tegumento del óvulo (Andème Ondzighi *et al.*, 2008). Se encuentra en contacto directo con las células del endosperma y sus células presentan citoplasma denso que se tiñe intensamente con tinciones histioquímicas (Andème Ondzighi *et al.*, 2008). En cruzamientos interespecíficos o intergenéricos las células del endotelio pueden volverse hiperplásticas, se dividen excesivamente y proliferan, especialmente cerca del extremo chalazal del endosperma. En este sentido, en trabajos con Solanáceas del género *Nierembergia*, Soto (2007) demostró que el desarrollo del endosperma primero y luego del embrión, son interrumpidos por la hiperplasia del endotelio en cruzamientos interespecíficos entre *N. linariaefolia* con *N. scoparia* y *N. ericoides*.

Por el contrario, en los cruzamientos intergenéricos realizados en el presente trabajo se observó una degradación anticipada del endotelio lo cual podrá deberse a mecanismos de MCP. En este sentido, Andème Ondzighi *et al.* (2008) estudiaron la influencia de la proteína disulfuro isomerasa 5 (PDI5) en la MCP de

las células endoteliales en *Arabidopsis*. La disminución abrupta en la expresión de PDI5 coincide con la proteólisis de las células endoteliales mientras que la interrupción genética de la función de la PDI5 acelera prematuramente la degradación de las células endoteliales, lo que lleva a una embriogénesis inviable.

La expresión de PDI5 en el endotelio precede a la MCP y su disminución coincide con los inicios de cambios en las células del endotelio tales como la ruptura y el colapso de las vacuolas, la contracción y degradación del citoplasma, condensación nuclear y fragmentación y ruptura de la pared celular. La pérdida de PDI5 conduce a la iniciación prematura de la MCP en las células endoteliales durante desarrollo del embrión y a la obtención de menos semillas viables. Estos autores proponen que se requiere PDI5 para la embriogénesis adecuada y la progresión temporal de la MCP al acompañar la inhibición de enzimas Cys proteasas cuando viajan desde el retículo endoplasmático a través del aparato de Golgi hasta las vacuolas antes del inicio de la MCP de las células endoteliales. Durante esta fase de transición en las células endoteliales, las vacuolas de almacenamiento de proteínas se convierten en las vacuolas líticas que median la MCP (Andème Ondzighi *et al.*, 2008).

En base a que una de las semillas híbridas del cruzamiento entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom Yellow completó su normal desarrollo y germinó formando una plántula normal que dio origen al híbrido HPC y, que embriones híbridos dentro de óvulos fecundados que no contenían endosperma normal continuaron desarrollándose durante 5 días adicionales, podría sugerirse que la técnica de rescate embrionario sería de utilidad para superar barreras reproductivas e incrementar el número de híbridos puente obtenidos. Resultados similares se han encontrado en cruzamientos entre *Fagopyrum esculentum* y *F. cymosum* donde el cultivo del embrión o del óvulo y el embrión permitió superar las barreras de incompatibilidad. Sin embargo, para facilitar el rescate embrionario debe ser determinado el momento adecuado para iniciar el proceso. Esto se puede lograr mediante la determinación del momento en que el embrión híbrido detiene su desarrollo o el momento en que el embrión degenera, así como el número de embriones sobrevivientes y la posibilidad técnica de extirpar los embriones jóvenes. En el caso de los embriones del cruzamiento entre *Petunia* y *Calibrachoa* debería iniciarse a los 5 DPP. De manera similar,

Wakizuka y Nakajima (1975) encontraron en *Petunia hybrida* que el 42% y 64% de los embriones de óvulos cultivados luego de 3 y 4 DPP se desarrollaron normalmente, mientras que el 11% de los embriones desarrolló luego de 2 DPP. En este sentido, en los cruzamientos entre *F. esculentum* Moench, x *F. homotropicum* Ohnishi pudo ser posible aumentar el número de embriones supervivientes cuando el rescate se realiza durante la etapa globular a los 5 DPP en lugar de durante la etapa de torpedo, que ocurre mucho más tarde (Woo *et al.*, 2008). En la familia Cactaceae, en cruzamientos entre *Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) y *H. undatus* (Haw.) D.R.Hunt. en ambas direcciones, fueron rescatados proembriones a los 5 DPP y cultivados exitosamente en medio *in vitro* obteniendo exitosamente plantas híbridas (Cisneros & Tel-Zur, 2010).

Las semillas cortadas de los cruzamientos intergenéricos involucrados en este estudio sólo presentaron el tegumento seminal desarrollado, similar al resultado logrado por Manrique *et al.* (2014) trabajando con diferentes accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H.Rob., donde obtuvieron 100% de semillas vacías en los cruzamientos dirigidos debido al aborto del embrión y del endosperma.

Otros estudios realizados en cruzamientos interespecíficos entre *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose y *H. undatus* produjeron semillas viables y vanas. La formación de semillas vanas se adjudica a la disfunción del endosperma que actúa como barrera poscigótica. Esto permite solamente el desarrollo normal de la cubierta de las semillas sin desarrollo del embrión y del endosperma (Cisneos *et al.*, 2011).

A partir de estas consideraciones, se podría asumir que la desintegración del endosperma y del embrión y la formación de semillas vacías podría regirse por procesos de autólisis celular iniciados en la fase embrionaria globular temprana (Daunay *et al.*, 2019).

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.** (2016). Endosperm-based postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* and *Capsella*. Plant Biology Master's program. <http://stud.epsilon.slu.se>
- An, L.;** Tao, Y.; Chen, H.; He, M.; Xiao, F.; Li, G. and Liu, Z. (2020). Embryo-endosperm interaction and its agronomic relevance to rice quality. *Frontiers in Plant Science*. 11: 587-641.
- Andrade Buono, R.;** Hudecek, R.; and Nowack, M. (2019). Plant proteases during developmental programmed cell death. *Journal of Experimental Botany*. 70(7): 2097-2112.
- Andème Ondzighi, C.;** Christopher, D.; Cho, E. J.; Chang, S. C. and Staehelin, L. (2008). *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *The Plant Cell*. 20(8): 2205-2220.
- Cisneros, A.** and Tel-Zur, N. (2010). Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the genus *Hylocereus* (Cactaceae). *Euphytica*. 174(1): 73-82.
- Daunay, M. C.;** Salinier, J.; and Aubriot, X. (2019). Crossability and diversity of eggplants and their wild relatives. In *The Eggplant Genome* (pp. 135-191). Springer, Cham.
- Cisneros, A.;** Garcia, R. and Tel-Zur, N. (2011). Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 206(12): 1076-1084.
- Depetris M. B.;** Acuña, C., Pozzi, F.; Quarín, C. and Felitti, S. (2018). Identification of genes related to endosperm balance number insensitivity in *Paspalum notatum*. *Crop Science*. 58(2): 813-822. doi:10.2135/cropsci2017.04.0260

- De Souza, E.;** F. Souza, M.; Rossi, M.; Pereira de Carvalho Costa, and A. Pinheiro Martinelli. (2017). Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. *Scientia Horticulturae* 223:53-61.
- Dinu I.;** Hayes R.; Kynast, R.; Phillips, R. L.; and Thill, C. A. (2005). Novel interseries hybrids in *Solanum*, section Petota. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 403–415.
- Doll, N. M.** and Ingram, G. C. (2022). Embryo–Endosperm Interactions. *Annual Review of Plant Biology*. 73.
- Escamez, S.** and Tuominen, H. (2014). Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *Journal of Experimental Botany*. 65(5): 1313-1321.
- Huysmans M.;** Lema, A.S.; Coll, N.S. and Nowack, M. K. (2016). Dying two deaths - programmed cell death regulation in development and disease. *Current Opinion in Plant Biology*. 35: 37–44
- Johnston, S.** and Hanneman R. E. (1982). Manipulations of Endosperm Balance Number Overcome Crossing Barriers Between. *Science*: 446-448
- Katsiotis, A.;** Hanneman, R. and Forsberg, R. (1995). Endosperm balance number and the polar-nuclei activation hypotheses for endosperm development in interspecific crosses of Solanaceae and Gramineae, respectively. *Theoretical and Applied Genetics*. 91(6): 848-855.
- Köhler, C.;** Dziasek, K. and Del Toro-De León, G. (2021). Postzygotic reproductive isolation established in the endosperm: mechanisms, drivers and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 376 (1826).
- Lafon-Placette C.;** Hatorangan, M.R.; Steige, K.A; Cornille, A.; Lascoux, M.; Slotte, T. and Köhler, C. (2018). Paternally expressed imprinted genes associate with hybridization barriers in *Capsella*. *Nature Plants* 4: 352-357.
- Lester, R.** and Kang, J. H. (1998). Embryo and Endosperm Function and Failure in *Solanum* Species and Hybrids. *Annals of Botany*. 82(4): 445-453.
- Li, J.;** Zhang, C.; Guan, C.; Luo, L.; Ren, L.; Wei, W.; ... and Fang, X. (2017). Analysis of intergeneric sexual hybridization between transgenic *Brassica oleracea* and *Sinapis alba*. *Euphytica*. 213: 1-10.
- Locato, V.** and De Gara, L. (2018). Programmed cell death in plants: an overview. *Plant Programmed Cell Death*. 1-8.

- Manrique, I.;** Gonzales, R.; Valladolid, A.; Blas, R. y Lizárraga, L. (2014). Producción de semillas en yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl. mediante técnicas de polinización controladas. *Ecología aplicada*. 13(2): 135-145.
- Camadro, E. L.,** and Masuelli, R. W. (1995). A genetic model for the endosperm balance number (EBN) in the wild potato *Solanum acaule* Bitt. and two related diploid species. *Sexual Plant Reproduction*. 8: 283-288.
- Masuelli, R. W.** and Camarro E.L. (1997). Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica*. 94:227-235.
- Milicia, V.;** Coviella, A.; Soto, M. y Chiesa, A. (2016). Mejoramiento de plantas nativas sudamericanas: altas temperaturas como herramienta para superar barreras precigóticas en el complejo *Calibrachoa-Nierembergia*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 32(2): 85-93.
- Thompson J. D.** and Lumaret R. (1992). The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends Ecology Evolution*. 7:302-307.
- Raghavan, V.** (2003). One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 39(5): 437-442.
- Städler, T.;** Florez-Rueda, A. and Roth, M. (2021). A revival of effective ploidy: the asymmetry of parental roles in endosperm-based hybridization barriers. *Current opinion in plant biology*. 61: 102015.
- Ng, S.;** De Clercq, I.; Van Aken, O.; Law, S. R.; Ivanova, A.; Willems, P.; ... and Whelan, J. (2014). Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Molecular plant*. 7(7): 1075-1093.
- Shivanna, K.** (2005). Barriers to hybridization. In: Shivanna, K.R. *Pollen Biotechnology for crop production and improvement*, Cambridge, Cambridge University Press, 261-272.
- Sprunck, S.** (2020). Twice the fun, double the trouble: Gmete interactions in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biolgy*. 53: 106-116.
- Valandro, F.;** Menguer, P.; Cabreira-Cagliari, C.; Margis-Pinheiro, M. and Cagliari, A. (2020). Programmed cell death (PCD) control in plants: New insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome. *Plant Science*. 299: 110603.

Van Aken, O. and Pogson, B. (2017) Convergence of mitochondrial and chloroplastic ANAC017/ PAP-dependent retrograde signalling pathways and suppression of programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*. 24:955-960.

Van Tuyl, J. and De Jeu M.J. (2005). Methods for overcoming interspecific crossing Barriers. In: Shivana, K.R. Sawhney. V. K. Eds. *Pollen biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press, 273-292.

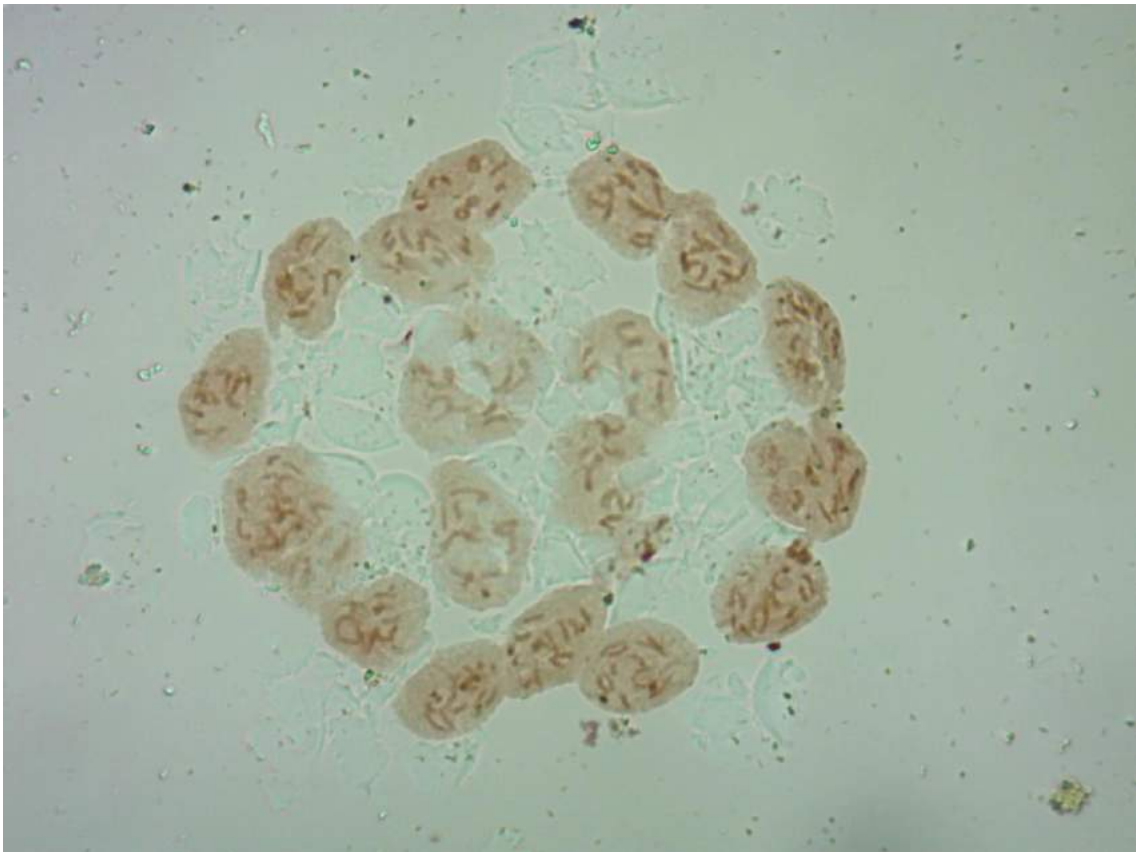
Wakizuka, T. and Nakajima, T. (1975). Development of Proembryo in Cultured Ovules of *Petunia hybrida* Vilm. *Japanese Journal of Breeding*. 25(3): 161-167.

Wolff, P.; Jiang, H.; Wang, G.; Santos-Gonzalez, J. and Köhler, C. (2015). Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4: e10074.

Woo, S.; Kim, S. H.; Tsai, K.; Chung, K.; Jong, S.; Adachi, T. and Choi, J. (2008). Pollen-tube behavior and embryo development in interspecific crosses among the genus *Fagopyrum*. *Journal of Plant Biology*. 51(4): 302-310.

Yermishin, A.; Polyukhovich, Y.; Voronkova, E. and Savchuk, A. (2014). Production of hybrids between the 2EBN bridge species *Solanum verrucosum* and 1EBN diploid potato species. *American Journal of Potato Research*. 91(6): 610-617.

CAPÍTULO III



CAPITULO III

Estudios de los cromosomas meióticos en el híbrido puente entre *Calibrachoa* y *Petunia*

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos importantes a considerar en los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos es el relativo a las similitudes genómicas entre las especies parentales. En el híbrido se van a encontrar los genomas de ambas especies y durante la profase-I meiótica se darán los procesos de apareamiento y recombinación entre cromosomas homeólogos que posteriormente podrían estar asociados formando quiasmas en metafase-I (Valenzuela Martínez, 2013).

El nivel de apareamiento homeólogo entre los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* va a depender de las relaciones evolutivas entre ellos. Así, es más frecuente que se produzca transferencia e introgresión entre especies que comparten altos niveles de similitud (Ferrari *et al.*, 2019; Ortega Albero, 2018). El apareamiento en metafase-I entre cromosomas de *Petunia inflata* y *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow es uno de los requisitos de los procesos de transferencia de caracteres deseables en las plantas puente (Lukaszewski, 2016; He *et al.*, 2018). Otro paso necesario para que el proceso de transferencia se produzca con éxito es la formación de gametos funcionales. Normalmente los híbridos son estériles debido a las aberraciones meióticas que llevan a la formación de gametos aneuploides y/o desequilibrios en su dotación cromosómica. La producción de polen fértil depende de procesos fisiológicos y bioquímicos controlados genéticamente donde disrupciones en la diferenciación del tejido esporógeno, en la meiosis, en el desarrollo de las micrósporas y del polen pueden resultar en la esterilidad masculina del híbrido puente (Mendes Bonato *et al.*, 2007). Sin embargo, existen mecanismos de formación de gametos genéticamente equilibrados que hacen que la tasa de fertilidad no sea completamente nula.

La estabilidad cariotípica y probablemente la heterosis en los híbridos son logrados a expensas de la flexibilidad evolutiva que provee la recombinación de diferentes genomas (Comai *et al.*, 2003). En la hibridación intergenérica donde en un mismo núcleo existen genomas de aspectos reproductivos, citogenéticos y evolutivos distintos se produciría un “shock genómico” que iniciaría la actividad de los

elementos móviles del genoma (Masuelli & Marfil, 2011; McClintock, 1984). Algunas de las manifestaciones de este shock involucran pérdida y/o ganancia de secuencias de ADN respecto de los genomioms parentales (Masuelli y Marfil, 2011). Algunos cruzamientos interespecíficos en *Brassica* y entre *Aegilops* L. y *Triticum* L. sugieren que la magnitud del impacto genómico estaría relacionada con la distancia filogenética entre las especies involucradas (Ochoa, 2007). Una manera de analizar la afinidad genómica en el híbrido entre *Petunia* y *Calibrachoa* (HPC) es mediante la inferencia de las relaciones entre complementos cromosómicos básicos en base al grado de su sinapsis (apareamiento cromosómico) y es, generalmente, estudiado en la metafase I meiótica en células madre del polen del híbrido. En estos estudios, se considera que los cromosomas que se aparean entre sí se encuentran relacionados, mientras que los que no se reconocen serían más distantes (Grusz *et al.*, 2017). Sobre esta base, los cromosomas pueden considerarse homólogos, parcialmente homólogos (homeólogos) o no homólogos. La posibilidad de hibridación, por lo tanto, es una medida indirecta del grado de relación genómica entre las especies parentales. Los cruzamientos entre especies con genomas similares usualmente producen frutos, mientras que entre los de genomas diferentes es común el aborto de los embriones o la esterilidad de los híbridos, entre otras manifestaciones (Singh, 2016).

La inviabilidad del polen de los híbridos o la ausencia de fructificación puede ser atribuida a la escasa homología cromosómica entre los padres del híbrido que resulta en la formación de gametas desbalanceadas (Singh, 2016). La reducción de la correspondencia cromosómica entre especies lejanamente relacionadas es atribuida a diferencias estructurales entre cromosomas perpetuadas durante la especiación (Poggio., 2016; Singh, 2016).

La familia Solanaceae, aunque cosmopolita, presenta la mayor concentración de géneros y especies en Sudamérica. En particular, las contribuciones sobre Solanaceae de Argentina que tratan de cromosomas meióticos son fragmentarias (por ej. Barboza, 1988; Bernardello, 1982; Bernardello *et al.*, 1990; Brücher, 1970; Brücher y Ross, 1953; Covas y Schnack, 1946; Di Fulvio, 1976, 1978, 1984a, 1984b; Hunziker *et al.*, 1985; Marks, 1966; Moore, 1981; Moscone, 1992; Ratera, 1938,

1940, 1942, 1943, 1944, 1947, 1952, 1954, 1969; Schnack y Covas, 1947; Subils, 1979).

El análisis del comportamiento meiótico del híbrido puente obtenido entre *Petunia* y *Calibrachoa*, determinando el número y los tipos de asociaciones cromosómicas (uni, bi, tri, tetravalentes, etc.) y las irregularidades que se presentan en las células estudiadas, constituye una valiosa herramienta para esclarecer las relaciones filogenéticas y taxonómicas, haciendo valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en éstas plantas. En particular, el estudio del comportamiento meiótico de las especies parentales y del híbrido puente permite determinar el grado de homología cromosómica entre estas especies en cruzas intergenéricas.

OBJETIVOS

- a) Observar los cromosomas de las especies parentales y del híbrido HPC mediante citogenética clásica para determinar el grado de homología cromosómica existente entre las especies parentales y la constitución del híbrido a utilizar como planta puente.
- b) Analizar la meiosis del híbrido intergenérico HPC con el fin de aportar información sobre el origen del bajo porcentaje de polen fértil obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudios de meiosis

Para los estudios de meiosis en las plantas híbridas y sus parentales, se recolectaron pimpollos de 3 mm de longitud. Inmediatamente después de su recolección, el material biológico fue fijado en solución de etanol a 96° y ácido acético glacial (3:1) v/v, y conservado en la misma solución en la heladera (5 °C). Posteriormente los botones florales fueron colocados en microtubos con una solución de ácido acético 45% durante 30 min, para luego colocarlos en portaobjetos donde se aislaron las anteras bajo lupa trinocular marca "Biotraza" modelo XTD-317T. Las anteras fueron coloreadas con una gota de colorante orceina acética a 2%, para posteriormente, machacarlas con un mango macizo de metal de 5 mm de diámetro por 10 cm de largo para separar las células madres de las micrósporas y eliminar el tejido de la cubierta. El producto de las anteras machacadas y coloreadas se cubre con un cubreobjetos. Seguidamente el portaobjeto con la preparación se calentó durante 30 s con un calentador a base de alcohol, cuidando de no llegar a la ebullición del preparado. Luego se procedió a su aplastado manual. Los meiocitos se analizaron en diacinesis, metafase I, anafase I, telofase I y telofase II en un total de 100 células. Se tomaron microfotografías a las células meióticas a través de un microscopio óptico binocular marca "Biotraza" modelo NLCD-307B acoplado en forma integral con una cámara táctil Pixera DIRactor a un sistema de cómputo que tiene el software Pixera Viewfinder Pro para análisis de imágenes.

RESULTADOS

1. Estudios de cromosomas meióticos del híbrido intergenérico HPC y sus parentales

En el presente estudio se da a conocer el número cromosómico del híbrido HPC y su comportamiento meiótico durante la microsporogénesis. A partir de los estudios de meiosis realizados en el híbrido se determina que su número cromosómico es $2n = 16$ (Fig. 3.1 a, b, c).

El apareamiento cromosómico fue irregular en la mayoría de las células analizadas. Diferentes configuraciones meióticas fueron identificadas, observándose la presencia de univalentes y bivalentes heteromórficos en distintas combinaciones durante las etapas de profase y metafase I, encontrando 36 células con 6 bivalentes (II) y 4 univalentes (I), 25 células con 7 bivalentes y 2 univalentes, 20 células con 4 bivalentes y 8 univalentes, 12 células con 3 bivalentes y 10 univalentes, 4 células con 2 bivalentes y 12 univalentes y 3 células con 3 bivalentes, 4 univalentes y 1 cuadrivalente (Fig. 3.1, 3.2 y 3.3). Otro tipo de irregularidad meiótica encontrada fue la formación de puentes sin fragmento (Fig. 3.1 d).

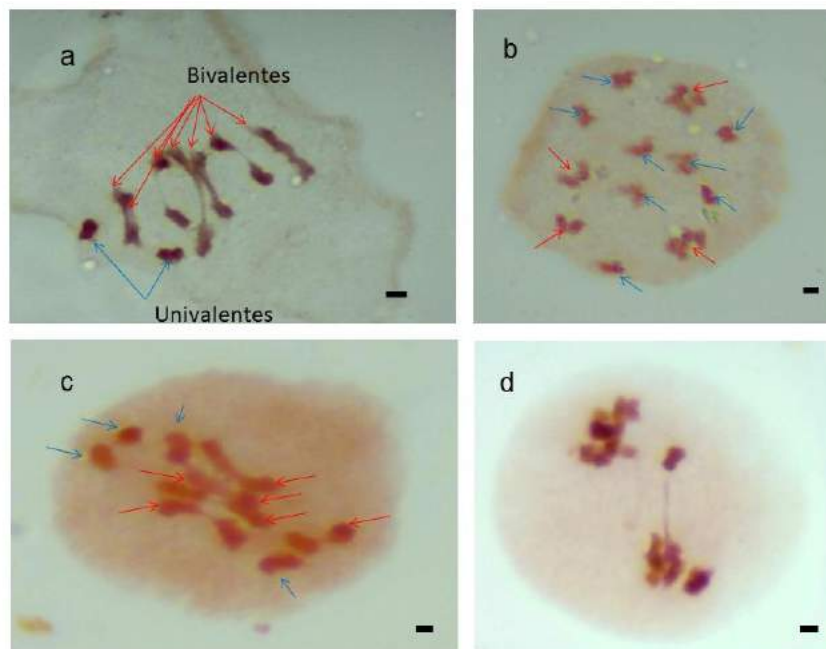


Figura 3.1. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- 7 II + 2 I en metafase I. b- 4 II + 8 I en diacinesis. c- 6 II + 4 I en metafase I. d- Puente sin fragmento. Flechas rojas indican bivalentes. Flechas azules indican univalentes. Barra = 10 μ m

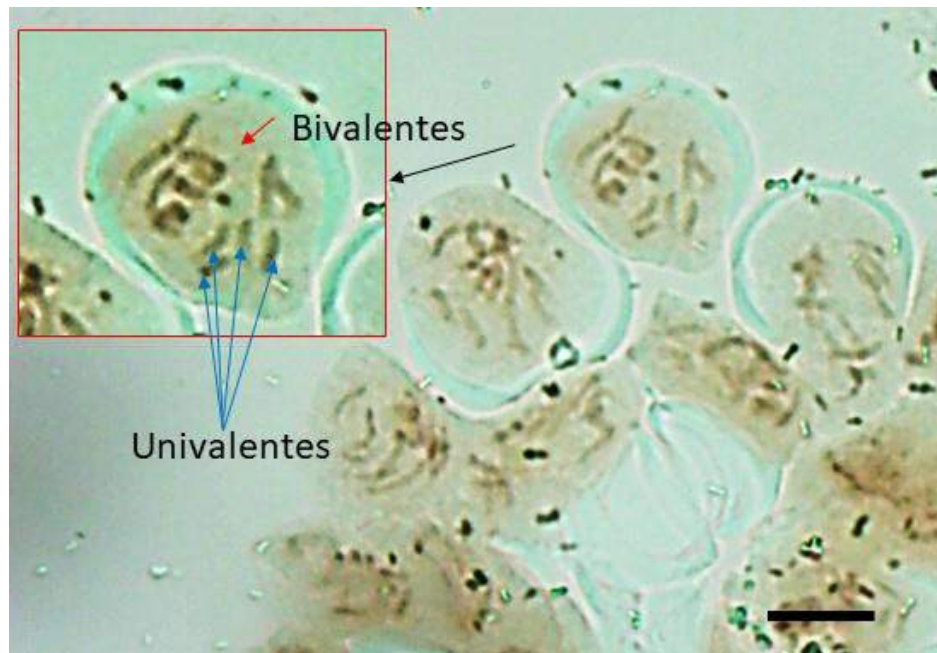


Figura 3.2. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- 6 bivalentes + 4 univalentes en metafase I. Flechas rojas indican bivalentes. Flechas azules indican univalentes. Barra = 50 μ m

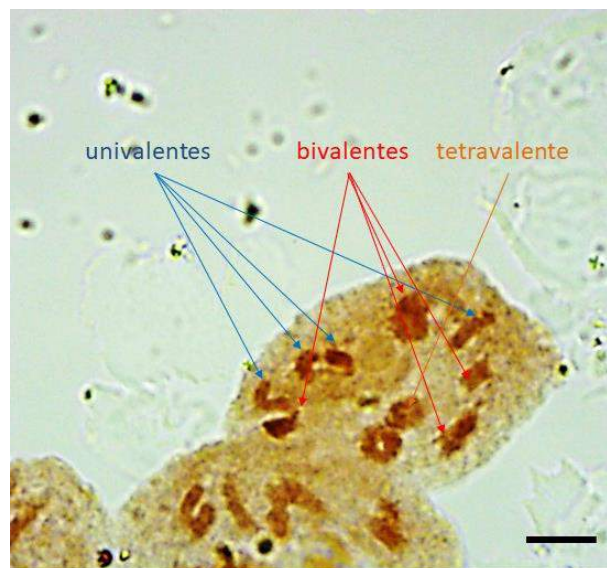


Figura 3.3. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- 4 bivalentes + 4 univalentes + 1 tetravalente en metafase I. Flechas rojas indican bivalentes. Flechas azules indican univalentes. Flecha naranja indica tetravalente. Barra = 50 μ m

En las especies parentales, *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow se produce desarrollo regular de la meiosis I como se observa en la diacinesis de *P. inflata* donde se muestra la presencia de 7 bivalentes ($2n = 14$) (Fig. 3.4) y en la diacinesis de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow donde se observan 9 bivalentes ($2n = 18$) (Fig. 3.5) condiciones normales para las especies parentales estudiadas.

En la figura 3.6 se observar los cromosomas de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow en el plano ecuatorial de las células en metafase I.

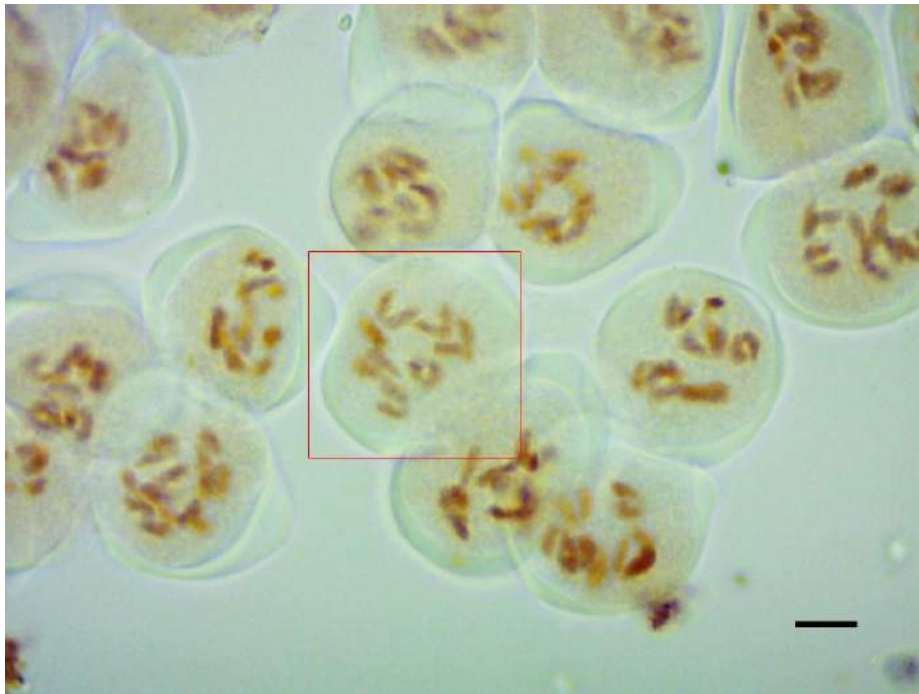


Figura 3.4. Cromosomas de *P. inflata* formando 7 bivalentes durante la etapa de diacinesis de la profase I. Barra = 10 μm .

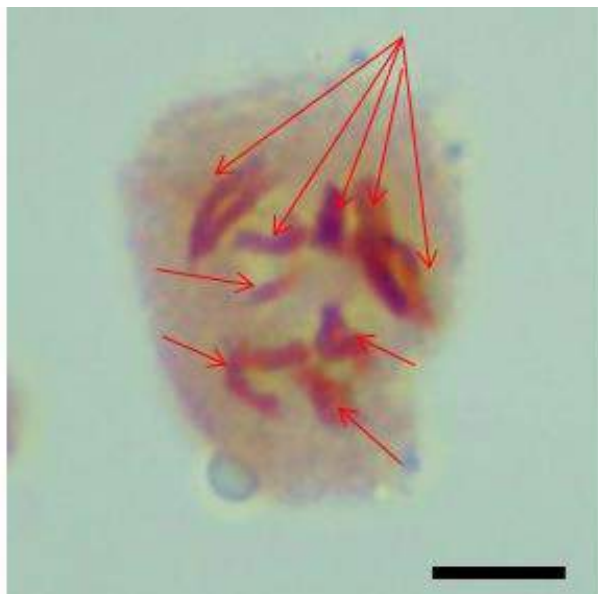


Figura 3.5. Cromosomas de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow formando 9 bivalentes durante la etapa de diacinesis de la protafase I. Barra = 10 μ m.



Figura 3.6. Células madre del polen de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow en metafase I meiótica. Barra = 10 μ m.

La presencia de husos acromáticos formando 3 polos fue otra de las irregularidades meióticas encontradas en la meiosis de HPC (Fig. 3.7). Además, se encontraron anafases con migraciones desbalanceadas y desincronizadas donde se observan cromosomas rezagados y/o adelantados con respecto al plano ecuatorial (Fig. 3.8). En varias células se han observado dos cromosomas que parecen tener un comportamiento independiente respecto del resto debido a que migran en una dirección diferente (Fig. 3.9 y 3.10).

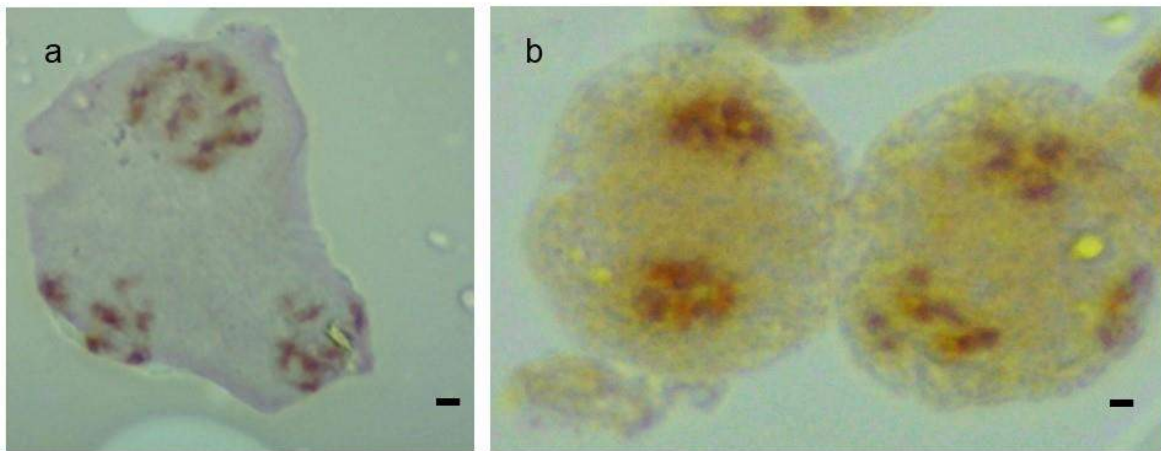


Figura 3.7. Irregularidades meióticas en células madre del polen en el híbrido HPC entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- Huso acromático tripolar. b- Izquierda: telofase regular con 2 polos. Derecha: telofase irregular con 3 polos. Barra = 10 μ m.

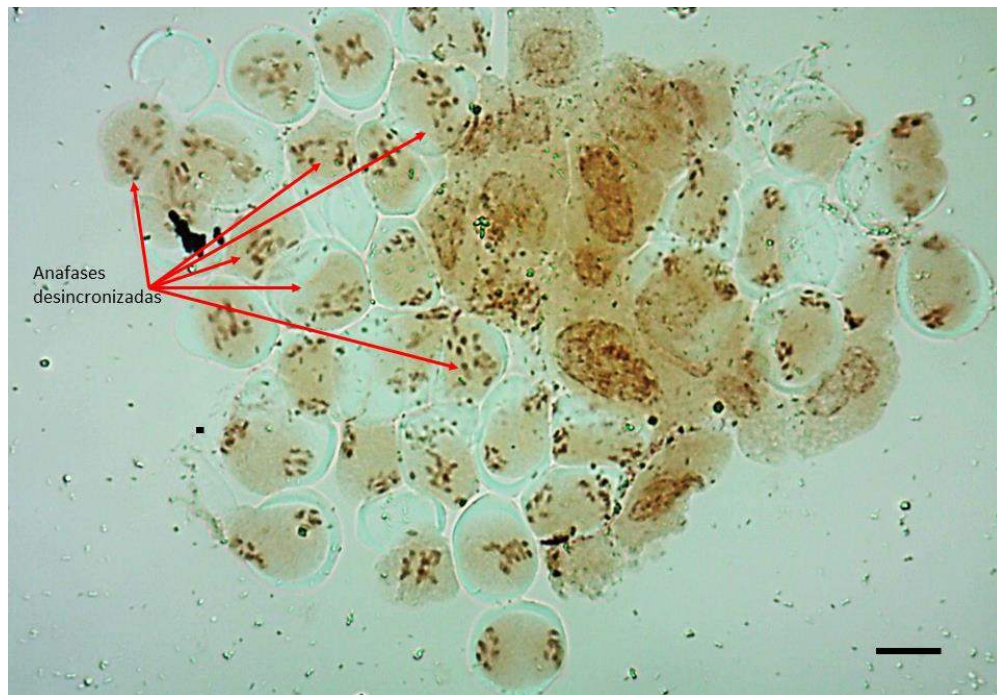


Figura 3.8. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. Anafases I desincronizadas con cromosomas atrasados y/o adelantados. Barra = 100 μ m

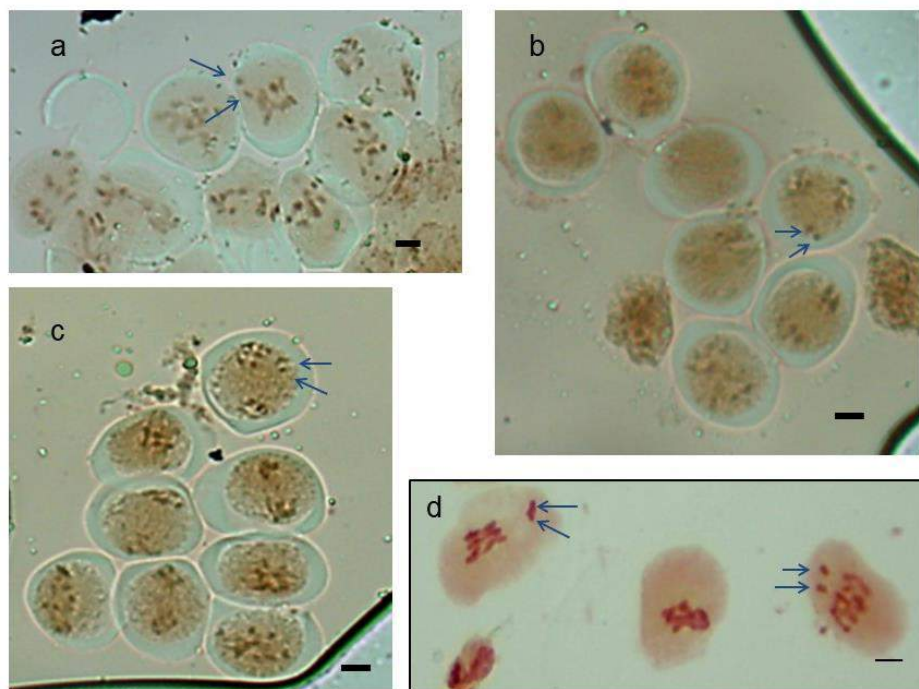


Figura 3.9. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a-, b-, c-, d-: Anafases I desincronizadas con presencia de dos cromosomas que migran en dirección diferente al resto (flechas azules). Barra = 10 μ m



Figura 3.10. Irregularidades meióticas en células madre del polen en híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. Anafases I desincronizadas con presencia de dos cromosomas que migran en dirección diferente al resto (flechas azules). Barra = 10 μ m

En este sentido, en varias células madre del polen de HPC se observa en la etapa de telofase de la meiosis I la presencia de polos donde se recuentan 7 cromosomas (Fig. 3.11). De igual manera, durante la meiosis II del híbrido HPC en la etapa de telofase II nuevamente se recuentan 7 cromosomas en los polos de varias células. También se observan células con diferente número de cromosomas en los polos y algunas de ellas con presencia de 5 polos (Fig. 3.12).

Estudios realizados durante la meiosis I de los cruzamientos puente entre *P. inflata* y HPC muestran la presencia de células con 7 cromosomas en los polos (Fig. 3.13).

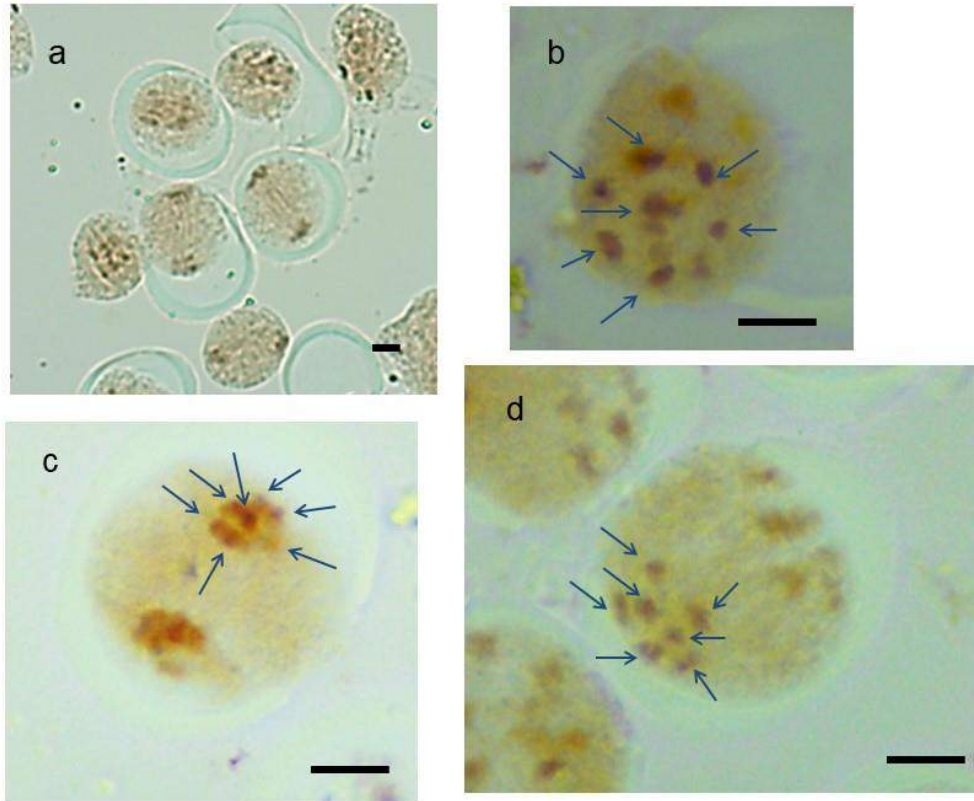


Figura 3.11. Telofases I meióticas en células madre del polen en híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a-, b-, c-, d-: Las flechas azules indican polos con 7 cromosomas. Barra = 10 μ m

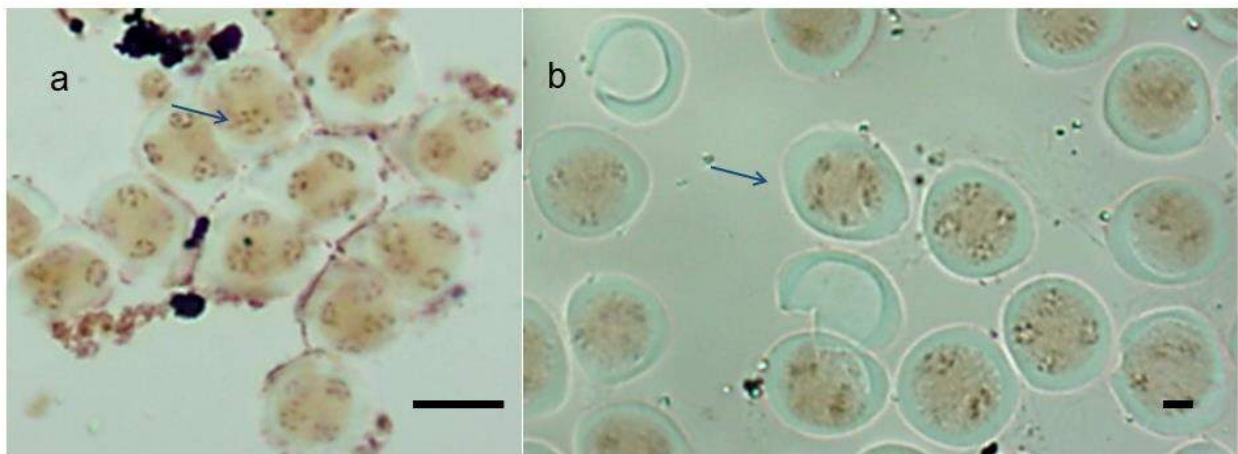


Figura 3.12. Telofases II meióticas en células madre del polen en híbrido entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- La flecha azul indica el recuento de 7 cromosomas en uno de los polos. Barra = 100 μ m. b- La flecha azul indica una célula con 5 polos y diferente número de cromosomas en ellos. Barra = 10 μ m

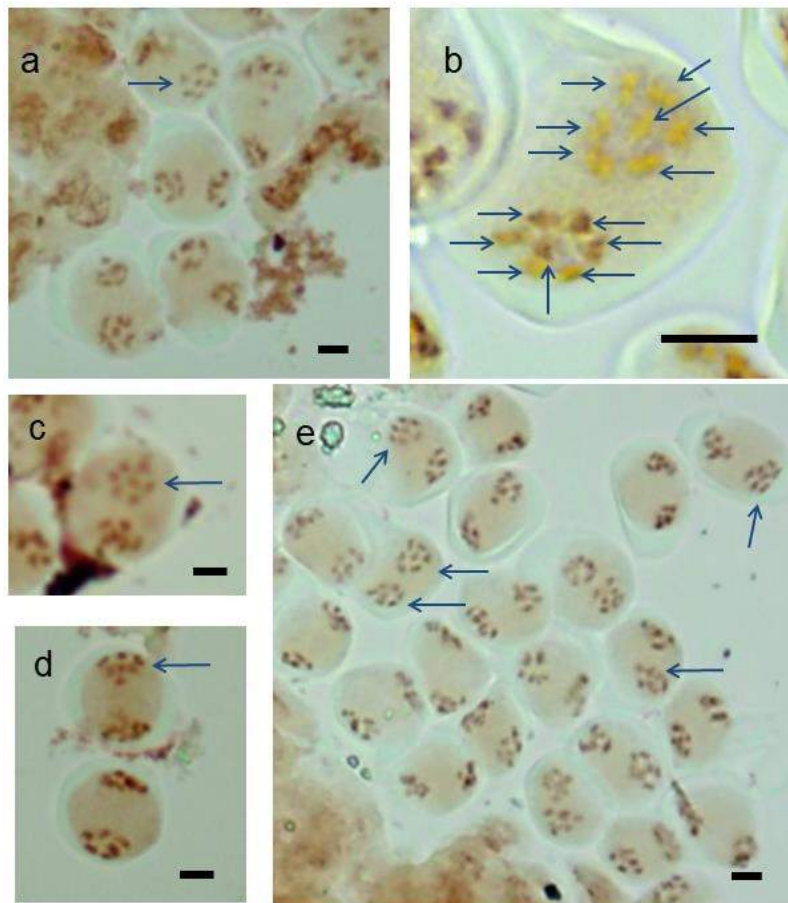


Figura 3.13. Telofases I meióticas en células madre del polen en cruzamientos puente entre *P. inflata* y HPC. a-, c-, d-, e-: Las flechas azules indican polos donde se recuentan 7 cromosomas. b- Detalle de una de las células donde las flechas azules señalan cada uno de los cromosomas. Barra = 10 μ m

Por otro lado, en las especies parentales utilizadas para comparar el normal funcionamiento de la meiosis, se observa en la etapa de telofase I polos con 7 cromosomas en *P. inflata* y 9 cromosomas en *C. x hybrida* var. Kabloom yellow (Fig. 3.14 y 3.15).

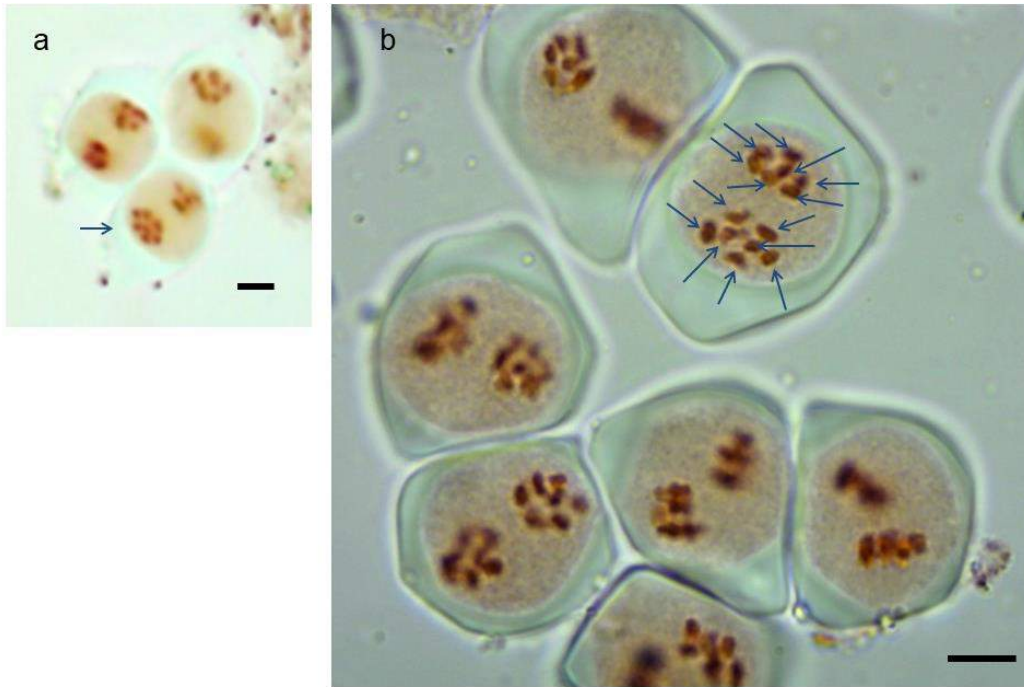


Figura 3.14. Telofases I meióticas en células madre del polen de *P. inflata*. a- Polo inferior donde se recuentan 7 cromosomas (flecha azul). b- Detalle de las células y número de cromosomas en los polos. Las flechas azules indican los cromosomas. Barra = 10 μ m

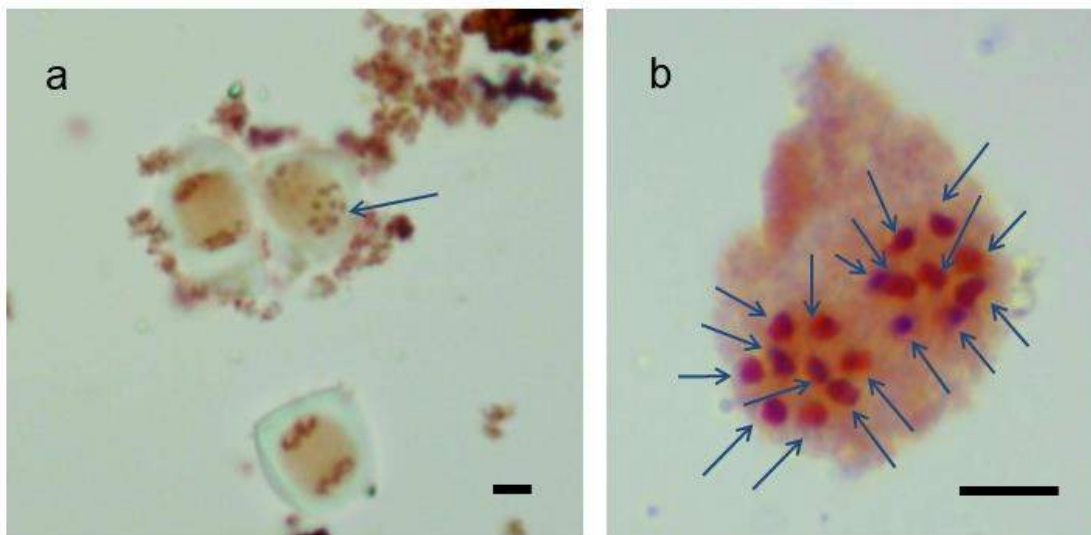


Figura 3.15. Telofases I meióticas en células madre del polen de *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- Polo inferior donde se recuentan 9 cromosomas (flecha azul). b- Detalle de las células y número de cromosomas en los polos. Las flechas azules indican los cromosomas. Barra = 10 μ m

La formación de tétradas de microsporas fue en apariencia normal para el híbrido HPC como para sus parentales. Algunas células madre del polen de HPC presentaron la formación de 5 microsporas.

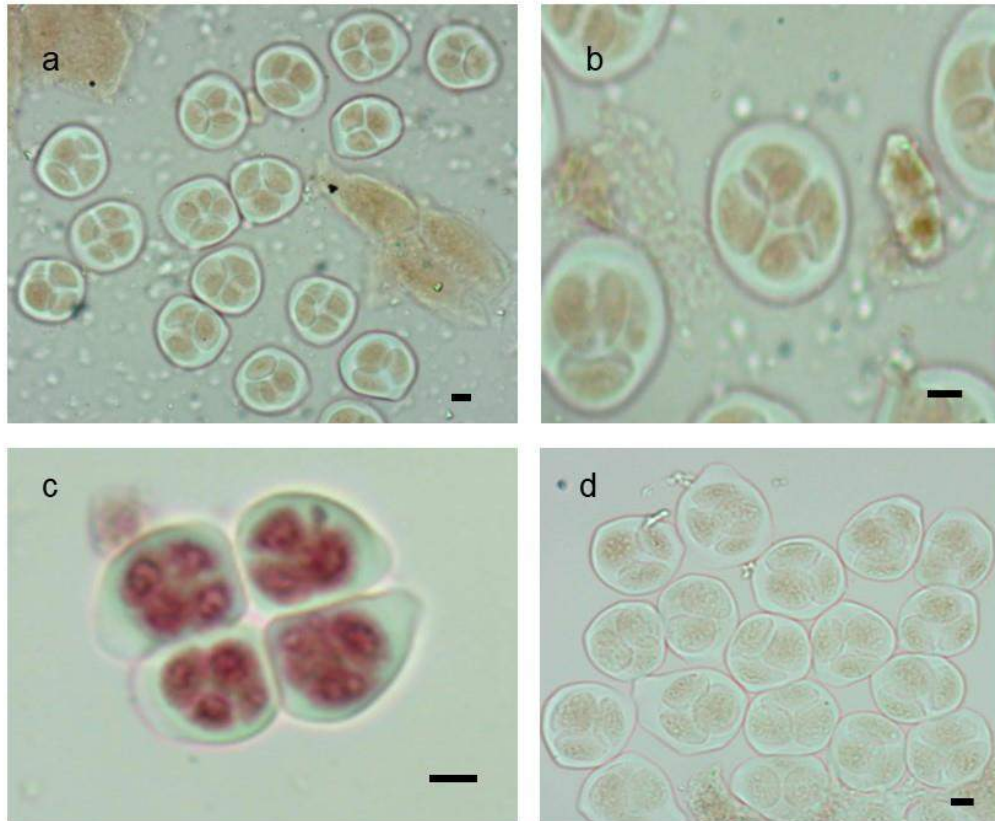


Figura 3.16. Tétradas de microsporas del híbrido HPC, *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. a- tétradas en apariencia normales de HPC. b- Detalle de célula madre de polen con 5 microsporas. c- tétradas de *P. inflata*. d- Tétradas de *C. x hybrida* 'Kabloom yellow'. Barra = 10 μ m

DISCUSIÓN

Las células madre del polen del híbrido puente HPC presentaron 16 cromosomas, número intermedio entre las dos especies parentales (*P. inflata* $2n=2x=14$; *C. x hybrida* var. Kabloom yellow $2n=2x=18$). Este valor permite confirmar nuevamente la naturaleza híbrida de HPC. Resultados similares fueron encontrados por Jin *et al.* (2020) en cruzamientos intergenéricos entre *Raphanus sativus* L., *Brassica oleracea* L. y *Brassica campestris* L. Por otro lado, Li *et al.* (2017) obtuvieron híbridos intergenéricos con un número de cromosomas intermedio entre sus parentales al cruzar *Brassica oleracea* por *Sinapis alba* L.

Durante la microesporogénesis se observaron anomalías cromosómicas lo cual indica la presencia de fallas en el apareamiento meiótico de gran parte de las células madre del polen. La alta presencia de univalentes incide en anafases desbalanceadas, ya que originan segregación aleatoria de los cromosomas no apareados. Esto puede causar la formación de gametos con números cromosómicos irregulares, que impiden su fertilidad como ocurre en varias células durante la meiosis de HPC (Gómez Martínez & Reyes Valdés, 2016). En general el grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas. Si el híbrido analizado es fértil y posee formación de bivalentes se puede deducir que hay afinidad (homología) entre los genomas parentales (Poggio *et al.*, 2004). El grado de irregularidades meióticas es una estimación de diferencias génicas y estructurales de las entidades en estudio. Configuraciones meióticas anormales con la existencia de diferente grado de asociación cromosómica presentan univalentes, bivalentes heteromórficos o multivalentes en profase-metáfase I y, en estadios posteriores puentes, fragmentos, husos multipolares, etc. que pueden deberse a heterocigosis para distintos tipos de rearrreglos estructurales (Poggio *et al.*, 2004). Las irregularidades cromosómicas observadas en cada etapa no son independientes, sino que demuestran la falta de homología entre gran parte de los juegos parentales de cromosomas. La falta de homología origina fallas en los entrecruzamientos y en el establecimiento de quiasmas, ya que una función de éstos es orientar a los cromosomas durante la etapa de metafase I (Mézar *et al.*,

2015). Las alteraciones en los mecanismos de su establecimiento y mantenimiento, originan errores en la segregación, que llevan a la producción de gametos desbalanceados (Ji *et al.*, 2022). Irregularidades cromosómicas similares se hallaron en cruzamientos intergenéricos entre *Oryza sativa* y *Luziola peruviana* Juss. ex J.F. Gmel. donde se muestra la presencia de diferentes anormalidades cromosómicas con número variable de bivalentes y univalentes, que llevan a la formación de gametos desequilibrados y granos de polen estériles (Moreno *et al.*, 2014). En otros trabajos científicos sobre el comportamiento meiótico de cruzamientos entre *Populus simonii* Carrière y *Populus euphratica* Olivier se presentan diferentes configuraciones cromosómicas y anormalidades meióticas que producen la segregación desbalanceada de cromosomas causando alta esterilidad de los gametos (Wang *et al.*, 2015). En cruzamientos intergenéricos entre *Helianthus annuus* L. y *Tithonia rotundifolia* (P. Mill.) S.F. Blake se han detectado irregularidades en el apareamiento meiótico lo cual impide una segregación cromosómica balanceada y no permite la formación de gametos viables. Esto resulta en una barrera a la reproducción sexual de los híbridos (Gómez Martínez & Reyes Valdés, 2016).

La observación de células meióticas en la etapa de metafase y anafase I mostró la presencia de dos cromosomas que se mantienen apartados y migran en dirección diferente al resto, lo que podría estar relacionado con la posterior eliminación de estos cromosomas que dejarían de ser parte del complemento cromosómico de los granos de polen viables del híbrido HPC, tal como se observa durante la etapa de telofase I y II, donde se cuentan 7 cromosomas en cada polo de las células, en lugar de 8 como sería lo esperable en un híbrido diploide con $2n=2x=16$.

La eliminación de cromosomas se establece como un proceso dinámico de estabilización del genoma que ocurre durante la hibridación y ha sido estudiado en diferentes tipos de Poaceae, y otros híbridos intergenéricos (Chaudhary *et al.*, 2013; Kalinka *et al.*, 2010). En cruzamientos entre *Oryza sativa* y *Luziola peruviana* se produce incompatibilidad genómica y se evidencia la eliminación de cromosomas. Es posible que algunos factores puedan desencadenar la delección para la estabilización del genoma recién formado, sin embargo, la base de los mecanismos

celulares involucrados en el proceso de eliminación cromosómica son escasamente entendidos (Moreno *et al.*, 2014).

La eliminación de cromosomas en híbridos se explica por la asincronía durante la síntesis de nucleoproteínas y procesos de división celular, formación de husos multipolares, degradación cromosómica por nucleasas específicas e inactivación de centrómeros, incompatibilidad del centrómero y proteínas de los cinetocoros entre los progenitores, no disyunción de cromosoma uniparental durante la anafase y la formación de micronúcleos (Moreno *et al.*, 2014; Chaudhary *et al.*, 2013). Afecta preferentemente a los cromosomas de una de las dos especies involucradas; la forma y velocidad de este proceso, así como la transmisión de cromosomas recombinantes en los siguientes procesos meióticos son cruciales para la estabilización del cariotipo de la progenie y concluye con la incorporación estable de material genético (Moreno *et al.*, 2014). La delección cromosómica es un proceso dinámico que genera la estabilización del genoma en cruzamientos intergenéricos por el reconocimiento y posterior eliminación del ADN, producto de la activación de endonucleasas y la fragmentación de uno de los genomas (Moreno *et al.*, 2014) por lo que se podría asumir que procesos semejantes pudieran regir la estabilización del genoma durante la formación de granos de polen fértiles en HPC los que presentan 7 cromosomas y de esta manera permiten aumentar la compatibilidad en los cruzamientos puente con *P. inflata* y *P. integrifolia* formando cigotos balanceados capaces de formar semillas fértiles y por consiguiente de aumentar el porcentaje de germinación.

La formación de células madre del polen que en el estado de tétrada presentan 5 micrósporas es otra de las irregularidades meióticas encontradas en HPC. En este sentido Yusmary (2008) trabajando sobre la citogenética de *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don y *Wedelia fruticosa* Jacq. encontró la presencia de 5 micrósporas formadas a partir de una célula madre del polen. Por otro lado, Pineda Balbuena (2019) observó en el género *Hemerocallis* L., que después de la segunda división meiótica, en ocasiones, en lugar de una tétrada podían generarse cinco, seis, siete e incluso hasta ocho microsporas. Este proceso en el híbrido HPC, podría relacionarse con la migración independiente de 2 cromosomas respecto del

resto durante la anafase/ telofase II. La observación de células madre del polen en telofase II con 5 puntos a los que llegan los cromosomas evidenciara la posibilidad de que estos cromosomas que se mantienen apartados, los cuales migraran en una dirección diferente y constituirían un punto distinto a los polos a los que llegarían los otros cromosomas y posteriormente formarían una quinta célula o bien se eliminarían como se explicó anteriormente.

Los avances en biología molecular y citogenética han traído desarrollos revolucionarios en la investigación de la mitosis y la meiosis, la estructura y manipulación de cromosomas, la expresión y regulación de genes y el silenciamiento de los mismos. Los estudios citogenéticos actuales ofrecen herramientas a través de imágenes que permiten integrar la genética, epigenética e información citológica que se pueden emplear para mejorar la investigación genómica molecular y cromosómica en taxones de plantas. Las técnicas de hibridación *in situ*, como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la hibridación genómica *in situ* (GISH), pueden identificar morfologías y secuencias cromosómicas, la cantidad y distribución de varios tipos de cromatina en los cromosomas y la organización del genoma durante la etapa de metafase de la meiosis. Las técnicas FISH y GISH presentan un modelo auténtico para analizar los cromosomas individuales, los segmentos cromosómicos o los genomas de plantas híbridas naturales y artificiales. El uso de estos enfoques abre nuevas vías para identificar con precisión las diferencias del genoma (Cui *et al.*, 2022; Younis *et al.*, 2015). Futuros estudios a través de la técnica de hibridación *in situ* permitirán conocer si los cromosomas perdidos efectivamente pertenecen al género *Calibrachoa*.

BIBLIOGRAFÍA

- Barboza, G.** (1988). Estudios morfológicos en Jaborosa (Solanaceae): Análisis comparado de las estructuras vegetativas y reproductivas relativas a la evolución del género. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Bernardello, L.** (1982). Estudios en *Lycium* (Solanaceae) II. Recuentos cromosómicos en entidades argentinas. *Hyckenia*. 1 (60): 321-328.
- Bernardello, L.**; Stiefkens, L. y Piovano, M. (1990). Números cromosómicos en Dicotiledóneas argentinas. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*. 26 (3-4): 149-157.
- Brücher, E.** (1970). Chromosomenzahlen argentinischer, chilenischer und venezolanischer Wild kartoffeln (*Solanum* sect. *Tuberarium*). *Cytologia*. 35: 153-170.
- Brücher, E.** y Ross, H. (1953). La importancia de las especies tuberíferas de *Solanum* del noroeste argentino como fuente de resistencia a las enfermedades. *Lilloa*. 26: 453-488.
- Comai, L.**; Madlung, A.; Josefsson, C. and Tyagi, A. (2003). Do the different parental 'heteromes' cause genomic shock in newly formed allopolyploids? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 358(1434): 1149-1155.
- Covas, G.** y Schnack, B. (1946). Número de cromosomas en Antófitas de la región de Cuyo (República Argentina). *Revista Argentina de Agronomía*. 13 (3): 153-16
- Chaudhary, H.**, Tayeng, T., Kaila, V. and Rather, S. (2013). Enhancing the Efficiency of Wide Hybridization Mediated Chromosome Engineering for High Precision Crop Improvement with Special Reference to Wheat × *Imperata cylindrica* System. *Nucleus*. 56: 7-14
- Cui, L.**, Chen, T., Zhao, X., Wang, S., Ren, X., Xue, J., and Zhang, X. (2022). Karyotype Analysis, Genomic and Fluorescence In Situ Hybridization (GISH and FISH) Reveal the Ploidy and Parental Origin of Chromosomes in *Paeonia* Itoh Hybrids. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(19): 11406.

- Di Fulvio, T.** (1976). Recuentos cromosómicos en *Nierembergia* (Solanaceae). Kurtziana. 9: 141-142.
- Di Fulvio, T.** (1978). Cromosomas gaméticos de *Nierembergia aristata* y *Bouchetia anómala* (Solanaceae). Kurtziana. 11: 118.
- Di Fulvio, T.** (1984a). Poliploidía en *Nierembergia* (Solanaceae). Kurtziana. 17: 25-30.
- Di Fulvio, T.** (1984b). Número cromosómico de *Nolana rostrata* (Solanaceae). Kurtziana 17: 169.
- Ferrari, M.**; Greizerstein, E. and Poggio, L. (2019). Genome size in three species of *Glandularia* and their hybrids. Repositorio.unlz.edu.ar
- Gómez Martínez, M.** y Reyes Valdés, M. H. (2016). Irregularidades meióticas en híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* L. x *Tithonia rotundifolia* (Mill.) SF Blake. Revista fitotecnia mexicana. 39(2): 117-121.
- Grusz, A. L.**; Sigel, E. and Witherup, C. (2017). Homoeologous chromosome pairing across the eukaryote phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution 117:83-94.
- Kalinka, A.**; Achrem, M. and Rogalska, S. (2010) Cytomixis-Like Chromosomes/Chromatin Elimination from Pollen Mother Cells (PMCs) in Wheat-Rye Allopolyploids. Nucleus. 53: 69-83
- He, L.**; Braz, G.; Torres, G. and Jiang, J. (2018). Chromosome painting in meiosis reveals pairing of specific chromosomes in polyploid *Solanum* species. Chromosoma. 127(4): 505-513.
- Hunziker, J.**; Xifreda, C. and Wulff, A. (1985). Estudios cromosómicos en Angiospermas de Sudamérica. Darwiniana. 26 (1-4): 7-14.
- Ji, X.**; Lelivelt, C.; Wijnker, E. and de Jong, H. (2022). Is partial desynapsis in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) pollen mother cells linked to aneuploidy in the crop? Euphytica. 218(6): 79.
- Jin, P.**; Zhu, Z.; Guo, X.; Chen, F.; Wu, Y.; Chen, J.; ... and Zhu, Z. (2020). Production and characterization of intergeneric hybrids by crossing radish with turnip and with Chinese kale. Euphytica. 216. 1-15.

- Li, J.;** Zhang, C.; Guan, C.; Luo, L.; Ren, L.; Wei, W.; ... and Fang, X. (2017) Analysis of intergeneric sexual hybridization between transgenic *Brassica oleracea* and *Sinapis alba*. *Euphytica*. 213: 1-10.
- Lukaszewski, A.** (2016). Manipulation of homologous and homoeologous chromosome recombination in wheat. In *Plant Cytogenetics* (pp. 77-89). Humana Press, New York, NY.
- Marks, G.** (1966). The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from *Solanum chacoense*. *Evolution*. 20 (4): 552-557.
- Masuelli, R. y Marfil, C. F.** (2011). Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *BAG. Journal of basic and applied genetics*. 22(1): 2-8.
- McClintock, B.** (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 226: 792–801.
- Mendes Bonato, A.;** Pagliarini, M. and Valle, C. (2007). Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (*Poaceae: Paniceae*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(5):831-837.
- Mézard, C.;** Jahns, M. T. and Grelon, M. (2015). Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends in Genetics*. 31(7): 393-401.
- Moore, D.** (1981). Chromosome numbers of Fueguian Angiosperms. *Boletim . Sociedade. Broteriana. Ser. 2*, 53 (2): 995 1012.
- Moreno, P.;** Caetano, C. M.; Olaya, C. A.; Agrono, T. C. and Torres, E. A. (2014). Chromosome elimination in intergeneric hybrid of *Oryza sativa* × *Luziola peruviana*. *Agricultural Sciences*. 5(13): 1344.
- Moscone, E.** (1992). Estudios de cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. *Darwiniana*. 261-297.
- Ochoa, M.** (2007). Apareamiento intergenómico y formación de polen no reducido en híbridos trigo x *Aegilops* (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid).
- Ortega Albero, N.** (2018). Análisis del modelo de segregación cromosómica del mandarino Moncada tetraploide. Tesis de grado en Biotecnología. Universidad Politecnica de Valencia. 34 pp.

- Pineda Balbuena, P.** (2019). Cultivo in vitro de anteras y granos de polen de plantas de *Heimerocallis* spp. Tesis de grado en Biología. Universidad de La Laguna.
- Poggio, L.**; Greizerstein, E. and Ferrari, M. (2016). Variability in the amount of homoeologous pairing among F1 hybrids. *AoB Plants* 8: plw30.
- Poggio, L.**; Naranjo, C.; Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (2004). Capítulo 5 Citogenética. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. 69-79.
- Ratera, E.** (1938). Determinación del número de cromosomas de varias especies de papas indígenas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires.1 (1): 1-8.
- Ratera, E.** (1940). Determinación del número de cromosomas de los *Solanum aculeados* de los alrededores de Buenos Aires *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. 1 (6): 1-7.
- Ratera, E.** (1942). Cariología de algunas variedades cultivadas de papas sudamericanas. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. 9 (3): 254-261.
- Ratera, E.** (1943). Número de cromosomas de algunas Solanáceas argentinas (1). *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. 10 (2): 318-325.
- Ratera, E.** (1944). Número de cromosomas de algunas Solanáceas argentinas (Segunda contribución). *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. 2 (9): 1-8.
- Ratera, E.** (1947). Número de cromosomas de *hycium ciliatum* Schlecht., y *Lycium elongatum* Miers. *Boletín de la Sociedad .Argentina de Botánica*. 2 (1): 43-44.
- Ratera, E.** (1952). Número de cromosomas de algunas Solanáceas argentinas (Tercera contribución). *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires.13 (2): 280-284.
- Ratera, E.** (1954). Número de cromosomas de *Solanum stuckertii* Bitter. *Boletín de la Sociedad .Argentina de Botánica*.5 (3): 153-154.
- Ratera, E.** (1969). Estudios cariológicos en Solanáceas. II. *Revista del Instituto Municipal de Botánica*. Buenos Aires. 3 (2): 59-66.
- Singh, R. J.** (2016). *Plant cytogenetics*. CRC press. 548 p.
- Schnack, B.** y Covas, G. (1947). *Estudios cariológicos en Antófitas*. Haumania.

1 (1): 1-10.

Subils, R. (1979). Cromosomas gaméticos de *Leptoglossis linifolia* (Solanaccae). Lorentzia. 3: 19-20.

Valenzuela Martínez, N. (2013). ¿Promueven las regiones cromosómicas específicas el apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos en meiosis? Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas.

Younis, A.; Ramzan, F., Hwang, Y. and Lim, K. (2015). FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. Plant cell reports. 34: 1477-1488.

Yusmary, J. (2008). Citogenetica de *Eclipta Alba* (L.) *Pluchea Carolinensis* (Jacq.) y *Wedelia Fruticosa* (Jacq.)(Asteraceae) (Doctoral dissertation, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre.).

Wang, J.; You, H.; Tian, J.; Wang Y.; Liu, M. and Duan, W. (2015). Abnormal meiotic chromosome behavior and gametic variation induced by intersectional hybridization in *Populus* L. Tree Genetics & Genomes. 11: 1-11.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La presente tesis abordó aspectos relacionados a la hibridación intergenérica entre el género *Calibrachoa* y *Petunia*. Esta investigación permitió la identificación de cruzamientos putativos para la obtención de híbridos y el avance en la localización e identificación de los sitios donde se presentan las barreras de incompatibilidad poscigóticas.

Se puede concluir que la combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* Kabloom yellow permitió superar las barreras de incompatibilidad mediante la obtención de un híbrido intergenérico que puede utilizarse como planta puente para transferir caracteres entre las especies de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*. La caracterización morfológica permitió identificar el híbrido que posteriormente fue corroborado por los estudios de viabilidad del polen, estudios moleculares y meióticos. En este trabajo se puede observar como el híbrido utilizado como puente aumenta el grado de compatibilidad entre ambos géneros, mediante cruzamientos exitosos con *P. inflata* y *P. integrifolia*, donde se obtuvieron 31 plantas híbridas con características morfológicas compartidas con los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

La identificación de cruzamientos intergénicos con alto porcentaje de fructificación abrió una ventana hacia importantes estudios sobre el desarrollo de los embriones híbridos. En estos, la incompatibilidad se manifiesta a través de la eliminación selectiva de células por muerte celular programada durante la embriogénesis, lo cual lleva a la autólisis de los embriones y del endosperma culminando en la formación de semillas vanas. Los estudios sobre el desarrollo embrionario permitieron conocer el momento oportuno para aplicar técnicas de rescate de embriones con miras a aumentar el número de plantas híbridas puente. De esta manera el rescate de proembriones a los 5 DPP podría ser una de las técnicas alternativas para superar barreras reproductivas de incompatibilidad poscigótica e incrementar el número de plantas puente entre *Petunia* y *Calibrachoa*.

Durante la hibridación intergenérica en un mismo núcleo existen genomas de aspectos reproductivos, citogenéticos y evolutivos distintos de manera que el apareamiento cromosómico durante la meiosis es irregular en la mayoría de las

células analizadas conformando diferentes configuraciones meióticas como la presencia de univalentes, bivalentes heteromórficos, cuadrivalentes, formación de puentes sin fragmento, husos acromáticos multipolares, anafases con migraciones desbalanceadas y desincronizadas con cromosomas atrasados y/o adelantados con respecto al plano ecuatorial. Estas irregularidades llevan a la formación de un alto porcentaje de gametos desbalanceados en cuanto a su número cromosómico y a la formación de granos de polen estériles. A partir de los resultados obtenidos se podría inferir que en los granos de polen fértiles la eliminación de cromosomas se establece como un proceso dinámico de estabilización del genoma que ocurre durante la hibridación por medio de la activación de endonucleasas, de esta manera, la delección cromosómica llevó a la obtención de un porcentaje menor (5%) de polen fértil suficiente para permitir los cruzamientos puentes entre HPC con *P. inflata* y *P. integrifolia* aumentando de esta manera el número de plantas híbridas entre estos géneros.

Los avances en biología molecular y citogenética transfieren desarrollos revolucionarios en la investigación de la meiosis, la estructura y manipulación de cromosomas, la expresión y regulación de genes y el silenciamiento de los mismos. Los estudios citogenéticos actuales ofrecen herramientas a través de imágenes que permiten integrar la genética, epigenética e información citológica. En este sentido, futuros estudios con aplicación de las técnicas de hibridación *in situ*, como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la hibridación genómica *in situ* (GISH), permitirán presentar un modelo auténtico para analizar los cromosomas individuales, los segmentos cromosómicos o los genomas de plantas híbridas y de esta forma confirmar si los cromosomas perdidos efectivamente pertenecen al género *Calibrachoa*.

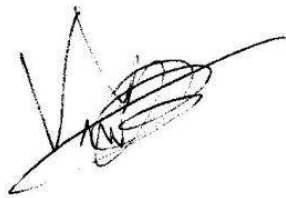
El cumplimiento de los objetivos de esta tesis permitió generar nuevos conocimientos sobre las relaciones intergenéricas, las barreras de incompatibilidad poscigóticas y aspectos vinculados con la biología floral, que sentarán las bases para la obtención de híbridos. Por otra parte, los resultados obtenidos en la utilización de plantas puente como herramienta de mejoramiento en el complejo *Calibrachoa-Petunia* permitirán continuar con la búsqueda de nuevas alternativas y ajustes en las técnicas ya evaluadas para ser utilizadas en trabajos futuros. Asimismo, es importante destacar que todos los estudios

realizados en esta tesis implican un valioso y esperado aporte en los planes de mejoramiento de variedades ornamentales.

La Dra. María Silvina Soto, directora del Instituto de Floricultura del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria hace constar que la tesis titulada:

“Utilización de plantas puente como herramienta de mejoramiento en el complejo Calibrachoa – Petunia”

que presenta el Ing. Agr. Víctor José Milicia para aspirar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológica ha sido realizada bajo su dirección y autoriza su presentación. En tal sentido se expide la presente en Lomas de Zamora a los 8 días del mes de junio de 2023.



Ing. Agr. Víctor José Milicia



Dra. María Silvina Soto

ANEXOS



ANEXOS

ANEXO 1-A Tablas estadísticas

Las pruebas estadísticas que muestran valor $p < 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

Tabla 1. Comparación de proporciones de tasas de fructificación (TF:Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos dirigidos utilizando *Petunia integrifolia* como parental femenino.

	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. thymifolia</i> (5/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. caesia</i> (8/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. hybrida</i> yellow (10/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>C. hybrida</i> blue (10/10)	<i>P. integrifolia</i> x <i>P. integrifolia</i> (10/10)
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	1	1	0.01	0.00035	0.000005	0.000005	0.000005
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)		1	0.01	0.00035	0.000005	0.000005	0.000005
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. thymifolia</i> (5/10)			1	0.20	0.016	0.016	0.016
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. caesia</i> (8/10)				1	0.23	0.23	0.23
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. hybrida yellow</i> (10/10)					1	1	1
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. hybrida blue</i> (10/10)						1	1
<i>P. integrifolia</i> x <i>P. integrifolia</i> (10/10)							1

Tabla 2. Comparación de proporciones de tasas de fructificación (TF:Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos dirigidos utilizando *Petunia inflata* como parental femenino.

	<i>P. inflata</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	<i>P. inflata</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)	<i>P. inflata</i> x <i>C. thymifolia</i> (4/10)	<i>P. inflata</i> x <i>C. caesia</i> (9/10)	<i>P. inflata</i> x <i>C. hybrida</i> yellow (10/10)	<i>P. inflata</i> x <i>C. hybrida</i> blue (10/10)	<i>P. inflata</i> x <i>P. inflata</i> (10/10)
<i>P. inflata</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	1	1	0.04	0.00006	0.000005	0.000005	0.000005
<i>P. inflata</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)		1	0.04	0.00006	0.000005	0.000005	0.000005
<i>P. inflata</i> x <i>C. thymifolia</i> (4/10)			1	0.03	0.005	0.005	0.005
<i>P. inflata</i> x <i>C. caesia</i> (9/10)				1	0.50	0.50	0.50
<i>P. inflata</i> x <i>C. hybrida yellow</i> (10/10)					1	1	1
<i>P. inflata</i> x <i>C. hybrida blue</i> (10/10)						1	1
<i>P. inflata</i> x <i>P. integrifolia</i> (10/10)							1

Tabla 3. Comparación de proporciones de tasas de fructificación (TF:Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos dirigidos utilizando *Petunia axillaris* como parental femenino.

	<i>P. axillaris</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	<i>P. laxillaris</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)	<i>P. axillaris</i> x <i>C. thymifolia</i> (0/10)	<i>P. axillaris</i> x <i>C. caesia</i> (0/10)	<i>P. axillaris</i> x <i>C. hybrida</i> yellow (0/10)	<i>P. axillaris</i> x <i>C. hybrida</i> blue (0/10)	<i>P. axillaris</i> x <i>P. laxillaris</i> (10/10)
<i>P. axillaris</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	1	1	1	1	1	1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)		1	1	1	1	1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>C. thymifolia</i> (0/10)			1	1	1	1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>C. caesia</i> (0/10)				1	1	1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>C. hybrida yellow</i> (0/10)					1	1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>C. hybrida blue</i> (0/10)						1	1
<i>P. axillaris</i> x <i>P. axillaris</i> (10/10)							1

Tabla 4. Comparación de proporciones de tasas de fructificación (TF:Frutos obtenidos / N° de flores polinizadas) en cruzamientos dirigidos utilizando *Petunia interior* como parental femenino.

	<i>P. interior</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	<i>P. interior</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)	<i>P. interior</i> x <i>C. thymifolia</i> (0/10)	<i>P. interior</i> x <i>C. caesia</i> (10/10)	<i>P. interior</i> x <i>C. hybrida</i> yellow (10/10)	<i>P. interior</i> x <i>C. hybrida</i> blue (8/10)	<i>P. interior</i> x <i>P. interior</i> (10/10)
<i>P. interior</i> x <i>C. ovalifolia</i> (0/10)	1	1	1	1	0.000005	0.00035	0.000005
<i>P. interior</i> x <i>C. linoides</i> (0/10)		1	1	1	0.000005	0.00035	0.000005
<i>P. interior</i> x <i>C. thymifolia</i> (0/10)			1	1	0.000005	0.00035	0.000005
<i>P. interior</i> x <i>C. caesia</i> (10/10)				1	1	0.23	1
<i>P. interior</i> x <i>C. hybrida yellow</i> (10/10)					1	0.23	1
<i>P. interior</i> x <i>C. hybrida blue</i> (8/10)						1	0.23
<i>P. interior</i> x <i>P. inflata</i> (10/10)							1

ANEXO 1-B: Reactivos estudios moleculares

1 M TRIS pH=8

Disolver 121 g de Tris-Base en aprox. 750 ml de H₂O destilada (d). Agregar HCl hasta llevar a pH. Completar con H₂O (d) hasta 1000 ml. Autoclavar.

0,5 M EDTA pH=8

Disolver 186,12 g de Na₂EDTA•2 H₂O (PM=372,24) en 750 ml de H₂O destilada. Agregar NaOH hasta llevar a pH. Completar con H₂O (d) hasta 1000 ml. Autoclavar.

5M NaCl

Disolver 22,2 g de NaCl (PM=58,44) en H₂O (d) hasta un volumen final de 1000 ml. Autoclavar.

TE pH=8 (10 mM Tris pH=8, 1mM EDTA pH=8)

STOCK	50 ml	100 ml	500 ml	1000 ml
1 M TRIS pH=8	0,5	1,0	5,0	10,0
0,5 M EDTA pH=8	0,1	0,2	1,0	2,0
H ₂ O(d)	Cantidad suficiente para	Cantidad Suficiente para	Cantidad suficiente para	Cantidad suficiente para

Buffer de extracción pH=8

Reactivos	Cantidades
H ₂ O (d) cantidad suficiente para	200 ml
TRIS 1M pH=8	20 ml
EDTA 0,5M	20 ml
NaCl 5M	56 ml

CTAB	4g
PVP-40	1% p/v
B Mercapto-etanol¹	2% v/v

Autoclavar. ¹ El B Mercapto-etanol debe agregarse a la solución inmediatamente antes de usar. TRIS: Tris (hidroximetil) amino metano, EDTA: ácido etilendiamintetraacético, CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, PVP: polivinil pirrolidona.

Preparación de dNTPs

Solución madre:

Tomar 100 µl de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): dATP, dGTP, dTTP, dCTP (concentración 100 mM) y llevar a 1000 µl con H₂O ultra pura estéril. Concentración final 10 mM.

Solución uso:

Tomar 10 µl de la solución madre (10 mM) y llevar a 80 µl con H₂O ultra pura estéril. Concentración final 1,25 mM.

Preparación de Iniciadores

Solución uso:

Tomar 20 µl de la solución madre (concentración 100 µM) y llevar a 100 µl con TE pH=8 estéril. Concentración final 20 µM.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS LIOFILIZADAS

(Según Pérez de la Torre, *et al.*, 2010)

- ✓ Calcular la cantidad de buffer de extracción a utilizar (1,1 ml por muestra)
- ✓ Precalentar el buffer de extracción + 2% B mercaptoetanol (v/v) a 65°C.
- ✓ Agregar 30-40 mg de la muestra liofilizada en un tubo de 2 ml junto con 1000 µl del buffer de extracción precalentado.
- ✓ Llevar al baño termostático (65°C) por 2 Hs con agitación constante.
- ✓ Agregar un volumen de Cloroformo/Octanol (24:1).

- ✓ Centrifugar 10 minutos a 12.000 RPM a 4°C. Separar sobrenadante (De ser necesario, repetir este paso centrifugando por 5 minutos)
- ✓ Precipitar con medio volumen de Isopropanol frío. Dejar a -20°C por 15 min, o bien a -20°C toda la noche.
- ✓ Centrifugar a 13.500 RPM por 40 minutos a 4°C. Descartar sobrenadante. Secar invertido sobre papel absorbente.
- ✓ Resuspender en 250 µl de TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55°C) hasta disolución total del ADN.
- ✓ Agregar 2,5 µl de RNasa A (10 mg/ml) (1% del vol. de resuspensión). Dejar 30 minutos a 37°C ó 1 hora a temperatura ambiente.
- ✓ Agregar un volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1). Centrifugar 10 minutos a 13.500 RPM a 4°C. Separar la parte acuosa en un nuevo tubo de 1,5 ml. Reservar.
- ✓ Agregar un volumen de TE 1X al tubo que contiene la fase orgánica y la interfase. Centrifugar 10 minutos a 13.500 RPM a 4°C. Separar la parte acuosa y agregarla al tubo que contiene el primer sobrenadante.
- ✓ Agregar un volumen de Cloroformo/Octanol (24:1). Centrifugar 10 minutos a 13.500 RPM a 4°C. Separar sobrenadante. Repetir este paso (de ser necesario) centrifugando por 5 min.
- ✓ Precipitar con 5% (volumen del sobrenadante) de NaCl 5M y medio volumen de Isopropanol frío.
- ✓ Dejar a -20°C por 15 min o a -20°C toda la noche.
- ✓ Centrifugar 40 min a 13.500 RPM a 4°C. Descartar sobrenadante.
- ✓ Lavar 2 veces con 500 µl de etanol al 70% cada vez. Centrifugar a 13.500 RPM a 4°C por 2 minutos. Descartar sobrenadante. Secar invertido sobre papel absorbente.
- ✓ Resuspender en cantidad suficiente de TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55°C) por 5 min o hasta disolución total del ADN.
- ✓ Conservar a -20°C.